

B1

**Identification of clones having specific enzyme activity - used to develop thermally stable proteins with improved enzymatic activity at lower temperatures**

**Patent Assignee:** DIVERSA CORP; DJAVAKHISHVILI T D; FREY G J; RECOMBINANT BIOCATALYSIS INC; SHORT J M

**Inventors:** DJAVAKHISHVILI T D; FREY G J; SHORT J M; SWANSON R V; WARREN P V

**Patent Family (55 patents, 23 countries)**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
WO 1997020918	A1	19970612	WO 1996US19457	A	19961206	199729	B
AU 199711489	A	19970627	AU 199711489	A	19961206	199742	E
EP 866853	A1	19980930	EP 1996942920	A	19961206	199843	E
			WO 1996US19457	A	19961206		
US 5939250	A	19990817	US 19958316	P	19951207	199939	E
			US 1996651568	A	19960522		
US 5962283	A	19991005	US 19958316	P	19951207	199948	E
			US 1996599171	A	19960209		
			US 1996646590	A	19960508		
US 6030779	A	20000229	US 1995503606	A	19950718	200018	E
			US 19958317	P	19951207		
			US 1995568994	A	19951207		
			US 1996657409	A	19960603		
			US 1996692002	A	19960802		
			US 1997944795	A	19971006		
JP 2000501606	W	20000215	WO 1996US19457	A	19961206	200019	E
			JP 1997521457	A	19961206		
US 6054267	A	20000425	US 19958317	P	19951207	200027	E
			US 1996692002	A	19960802		
AU 720334	B	20000525	AU 199711489	A	19961206	200034	E
AU 200048933	A	20001005	AU 199711489	A	19961206	200054	NCE
			AU 200048933	A	20000731		
US 6171820	B1	20010109	US 19958311	P	19951207	200104	E
			US 19958316	P	19951207		
			US 1996651568	A	19960522		
			US 1996677112	A	19960709		
			US 1996760489	A	19961205		

A novel process for identifying clones having a specified enzyme activity, comprises screening for the specified enzyme activity in a library of clones prepared by: (i) selecting and recovering target nucleic acid from a nucleic acid population derived from at least two microorganisms, by use of at least one nucleic acid or nucleic acid like hybridising probe comprising at least a portion of a nucleic acid sequence encoding a protein having a specified activity; and (ii) transforming a host with recovered target nucleic acid to produce a library of clones comprised of a subset of the original nucleic acid population which are screened for a specific activity. Also claimed is a process for obtaining a protein having a specified protein activity derived from a heterogenous nucleic acid population, which comprises screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing nucleic acid from the heterogenous nucleic acid population which have been modified or mutagenised towards production of the specified activity.

**USE** - The method can be used to provide a thermostable enzyme having improved enzyme activities at lower temperature (claimed).

**International Classification (Main):** A61K-031/00, C07H-021/04, C12N-015/09, C12N-009/00, C12P-013/00, C12P-002/06, C12P-021/02, C12P-021/06, C12Q-001/00, C12Q-001/68, G01N-033/53  
**(Additional/Secondary):** A01H-001/00, A01H-005/00, A01N-043/04, A01N-061/00, A61K-031/70, A61K-048/00, C07H-021/02, C07K-001/00, C07K-014/00, C07K-014/47, C07K-017/00, C12N-001/00, C12N-001/08, C12N-001/20, C12N-015/00, C12N-015/63, C12N-015/70, C12N-015/74, C12N-015/82, C12N-015/85, C12N-015/87, C12N-005/00, C12N-005/02, C12N-005/04, C12N-005/06, C12N-009/02, C12N-009/10, C12N-009/12, C12N-009/14, C12N-009/16, C12N-009/20, C12N-009/26, C12N-009/88, C12P-019/34, C12P-021/00, C12P-021/04, C12Q-001/26, C12Q-001/34, C12Q-001/48, C12Q-001/527, C12Q-001/70, G01N-033/48, G01N-033/50, G01N-033/566, G06F-019/00

### **Original Publication Data by Authority**

Australia

Publication Number: AU 200048933 A (Update 200054 NCE)

Publication Date: 20001005

Assignee: DIVERSA CORP; US (DIVE-N)

Inventor: SHORT J M

Language: EN

Application: AU 199711489 A 19961206 (Division of application) AU 200048933 A 20000731 (Local application)

Priority: AU 200048933 A 20000731 (Local application)

Related Publication: AU 720334 A (Division of patent)|AU 2003200812 A1 (Update 200452 E)

Publication Date: 20030501

\*\*Method of screening for enzyme activity\*\*

Assignee: DIVERSA CORP (DIVE-N)

Inventor: SHORT J M

Language: EN

Application: AU 200048933 A 20000731 (Division of application) AU 2003200812 A 20030305 (Local application)|AU 2003200812 A2 (Update 200417 NCE)

Publication Date: 20030501

Assignee: DIVERSA CORP (DIVE-N)

Inventor: SHORT J M

Language: EN

Application: AU 200048933 A 20000731 (Division of application) AU 2003200812 A 20030305 (Local application)

Priority: AU 2003200812 A 20030305 (Local application)|AU 720334 B (Update 200034 E)

Publication Date: 20000525

Assignee: DIVERSA CORP; US (DIVE-N)

Language: EN

Application: AU 199711489 A 19961206 (Local application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US 1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Related Publication: AU 9711489 A (Previously issued patent) WO 1997020918 A (Based on OPI patent )|AU 756201 B (Update 200320 NCE)

Publication Date: 20030109

Assignee: DIVERSA CORP; US (DIVE-N)

Inventor: SHORT J M

Language: EN

Application: AU 199711489 A 19971206 (Division of application) AU 200048933 A 20000731 (Local application)

Priority: AU 200048933 A 20000731 (Local application)

Related Publication: AU 200048933 A (Previously issued patent) AU 720334 A (Division of patent)|AU 199711489 A (Update 199742 E)

Publication Date: 19970627

Language: EN

Application: AU 199711489 A 19961206 (Local application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US 1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Related Publication: WO 1997020918 A (Based on OPI patent )

## Germany

Publication Number: DE 69631787 E (Update 200425 E)

Publication Date: 20040408

Assignee: DIVERSA CORP; US (DIVE-N)

Language: DE

Application: DE 69631787 A 19961206 (Local application) EP 1996942920 A 19961206 (Application)  
WO 1996US19457 A 19961206 (PCT Application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US  
1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Related Publication: EP 866853 A (Based on OPI patent ) WO 1997020918 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C12Q-1/68(A)

Current IPC: C12Q-1/68(A)

### European Patent Office

Publication Number: EP 1130090 A2 (Update 200151 E)

Publication Date: 20010905

**\*\*SCREENING-METHODE ZUR BEREITSTELLUNG EINES THERMOSTABILEN ENZYMS  
METHOD OF SCREENING FOR THERMOTABLE ENZYME ACTIVITY PROCEDE DE  
CRIBLAGE D'UNE ENZYME THERMOTABLE\*\***

Assignee: Diversa Corporation, 10665 Sorrento Valley road, San Diego, CA 92121, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., 320 Delage Drive, Encinitas, California 92024, US

Agent: VOSSIUS PARTNER, Siebertstrasse 4, 81675 Munchen, DE

Language: EN

Application: EP 1996942920 A 19961206 (Division of application) EP 2001102857 A 19961206 (Local application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US  
1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Related Publication: EP 866853 A (Division of patent)

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT  
SE

Original IPC: C12N-9/00(A)

Current IPC: C12N-9/00(A)

Original Abstract: Disclosed are processes to identify desired enzymatic activity from a pool of DNA collected from one or more organisms or a DNA subjected to random directed mutagenesis. The methods involve the generation of DNA library in a host cell and screening for the desired activity. The process can be applied to develop thermally stable proteins having improved enzymatic activity at lower temperature.

Claim: 1.A process for providing a thermostable enzyme having improved enzyme activities at lower temperatures said enzyme being a member from the group consisting of an enzyme or a polynucleotide encoding said enzyme comprising: \* (a)subjecting to mutagenesis at least one enzyme which is stable at a temperature of at least 60(deg), C; and \* (b)screening mutants produced in (a) for a mutated enzyme or polynucleotide encoding a mutated enzyme which enzyme is stable at a temperature of at least 60 (deg)C and which has an enzyme activity at a temperature of less than 50(deg)C; and which has activity greater than the enzyme from step (a).|EP 866853 A1 (Update 199843 E)

Publication Date: 19980930

**\*\*VERFAHREN ZUM SCREENING ENZYMATISCHER AKTIVITAT METHOD OF SCREENING FOR ENZYME ACTIVITY PROCEDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE\*\***

Assignee: Recombinant Biocatalysis Inc., 505 Coast Boulevard South, La Jolla, CA 92037-4616, US  
(RECO-N) DIVERSA CORP (DIVE -N)

Inventor: SHORT, Jay, M., 320 Delage Drive, Encinitas, CA 92024, US

Agent: VOSSIUS PARTNER, Postfach 86 07 67, 81634 Muenchen, DE

Language: EN

Application: EP 1996942920 A 19961206 (Local application) WO 1996US19457 A 19961206 (PCT Application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US

1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Related Publication: WO 1997020918 A (Based on OPI patent )

Designated States: (Regional Original) AT B E CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

Original IPC: C12N- 9/00(A)

Current IPC: C12N-9/00(A)

Original Abstract: Disclosed are processes to identify desired enzymatic activity from a pool of DNA collected from one or more organisms or a DNA subjected to random directed mutagenesis. The methods involve the generation of DNA library in a host cell and screening for the desired activity. The process can be applied to develop thermally stable proteins having improved enzymatic activity at lower temperature. [EP 866853 B1 (Update 200417 E)]

Publication Date: 20040303

\*\*VERFAHREN ZUM SCREENING ENZYMATISCHER AKTIVITAT METHOD OF SCREENING FOR ENZYME ACTIVITY PROCEDE DE DETECTION D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE\*\*

Assignee: DIVERSA CORPORATION, 10665 Sorrento Valley Road, San Diego, California 92121, US (DIVE-N)

Inventor: S HORT, Jay, M., 320 Delage Drive, Encinitas, CA 92024, US

Agent: VOSSI US PARTNER, Postfach 86 07 67, 81634 Munchen, DE

Language: EN

Application: EP 1996942920 A 19961206 (Local application) WO 1996US19457 A 19961206 (PCT Application) EP 2001102857 A 19961206 (Related to application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US

1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Related Publication: EP 1130090 A (Related to patent) WO 1997020918 A (Based on OPI patent )

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

Original IPC: C12Q-1 /68(A)

Current IPC: C12Q-1/68(A)

Claim: 1. Verfahren zur Gewinnung einer Enzymaktivitat von Interesse, wobei das Verfahren die Schritte einschliesst: \* (a) Bereitstellen einer ersten Bibliothek mit DNA, die von mindestens einem Mikroorganismus erhalten wird; \* (b) Binden mindestens eines Teils der codierenden Sequenzen der ersten Bibliothek an eine fur die Enzymaktivitat von Interesse spezifische Nucleinsauresonde, um eine DNA-Teilmenge zu bilden; \* (c) Bereitstellen einer zweiten Bibliothek, die eine Expressionsbibliothek ist, wobei DNA von der in Schritt (b) erhaltenen DNA-Teilmenge verwendet wird; und \* (d) Durchmustern der zweiten Bibliothek auf enzymatische Aktivitat. 1. A method for obtaining an enzyme activity of interest, said method including the steps of: \* (a) providing a first library with DNA obtained from at least one microorganism; \* (b) binding at least a portion of the coding sequences of the first library to a nucleic acid probe specific for the enzyme activity of interest to create a DNA subset; \* (c) providing a second library which is an expression library using DNA from the DNA subset obtained from step (b); and \* (d) screening the second library for the enzyme activity. 1. Methode pour obtenir une activite enzymatique d'interet, ladite methode incluant les etapes de: \* (a) fournir une premiere banque avec de l'ADN obtenu a partir d'un microorganisme; \* (b) lier au moins une portion des sequences codantes de la premiere banque a une sonde d'acide nucleique specifique de l'activite enzymatique d'interet pour creer un sous-groupe d'ADN; \* (c) fournir une deuxième banque qui est une banque d'expression utilisant l'ADN du sous-groupe d'ADN obtenu a l'etape (b); et \* (d) cribler la deuxième banque pour l'activite enzymatique.

## Japan

Publication Number: JP 2000501606 W (Update 200019 E)

Publication Date: 20000215

Language: JA (68 pages)

Application: WO 1996US19457 A 19961206 (PCT Application) JP 1997521457 A 19961206 (Local application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US 1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Related Publication: WO 1997020918 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C12N-15/09(A) C12N-9/00(B)

Current IPC: C12N-15/09(A) C12N-9/00(B)|JP 2001078786 A (Update 200122 E)

Publication Date: 20010327

**\*\*SCREENING OF ENZYMATIC ACTIVITY\*\***

Assignee: DIVERSA CORP (DIVE-N)

Inventor: SHORT JAY M

Language: JA (26 pages)

Application: JP 1997521457 A 19961206 (Division of application) JP 2000239967 A 19961206 (Local application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US 1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Original IPC: C12N-15/09(A) C12N-9/02(B) C12N-9/10(B) C12N-9/14(B) C12N-9/88(B) C12Q-1/26 (B) C12Q-1/34(B) C12Q-1/48(B) C12Q-1/527(B) C12Q-1/68(B)

Current IPC: C12N-15/09(A) C12N-9/02(B) C12N-9/10(B) C12N-9/14(B) C12N-9/88(B) C12Q-1/26 (B) C12Q-1/34(B) C12Q-1/48(B) C12Q-1/527(B) C12Q-1/68(B)

**United States**

Publication Number: US 20020031771 A1 (Update 200222 E)

Publication Date: 20020314

**\*\*Sequence based screening\*\***

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: LISA A. HAILE, PH.D., GRAY CARY WARE FREIDENRICH LLP, Suite 1600, 4365 Executive Drive, San Diego, CA, US

Language: EN

Application: US 19958317 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996692002 A 19960802 (Continuation of application) US 2000557276 A 20000424 (C-I-P of application) US 2000571499 A 20000515 (C-I-P of application) US 2001858616 A 20010515 (Local application)

Related Publication: US 6054267 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) G01N-33/48(B) G01N-33/50(B) G06F-19/00(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A) G01N-33/48(B) G01N-33/50(B) G06F-19/00(B)

Original US Class (secondary): 4356 70220

Original Abstract: Provided is a method of obtaining a nucleic acid profile of a sample. The method includes creating a DNA library from a plurality of nucleic acid sequences of a mixed population of organisms and sequencing at least one clone in the DNA library. The sequence is compared to a database and identifying sequences in the database which have homology to a clone in the library thereby obtaining a nucleic acid profile of the mixed population of organisms.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method of obtaining a nucleic acid profile of a sample, comprising: \* obtaining a plurality of nucleic acid sequences from the sample, wherein the sample comprises a mixed population of organisms; \* sequencing at least one clone in a library generated from the plurality of nucleic acid sequences; \* performing a database search using an algorithm to compare the sequence of the at least one clone with the data in the database, wherein the database contains a plurality of nucleic acid sequences from a plurality of organisms; and \* identifying sequences in the database which have homology to the at least one clone sequence, thereby obtaining a nucleic acid profile of the sample.|US 20020068340 A1 (Update 200241 E)

Publication Date: 20 020606

**\*\*COMBINATORIAL ENZYME DEVELOPMENT\*\***

Assignee: SHORT, JAY M., Encinitas, CA, US (SHOR-I)

Inventor: SHORT, JAY M., Encinitas, CA, US

Agent: LISA A. HAILE, Ph.D., GRAY CARY WARE FREIDENRICH LLP, 4365 E XECUTIVE DRIVE, SUITE 1600, SAN DIEGO, CA, US

Language: EN

Application: US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19 960522

(Continuation of application) US 1999375605 A 19990817 (Division of application) US 1999401861 A 19990922 (Local application)

Original IPC: C12Q-1/68(A)

Current IPC: C12Q-1/68(A)

Original US Class (secondary): 435183 4356 43569.1 53623.1 53623.2

Original Abstract: Disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity derived from a heterogeneous DNA population by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from the heterogeneous DNA population which have been exposed to directed mutagenesis towards production of the specified enzyme activity. Also disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from a pool of DNA populations which have been exposed to directed mutagenesis in an attempt to produce in the library of clones DNA encoding an enzyme having one or more desired characteristics which can be the same or different from the specified enzyme activity.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity derived from a heterogeneous DNA population, which process comprises: \* screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from the heterogeneous DNA population which have been exposed to directed mutagenesis towards production of the specified enzyme activity.|US 20020119457 A1 (Update 200259 E)

Publication Date: 20020829

**\*\*End selection in directed evolution\*\***

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I) Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US (FREY-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US

Agent: GARY CARY WARE FRIENDENRICH LLP, 4365 EXECUTIVE DRIVE, SUITE 1600, SAN DIEGO, CA, US

Language : EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205 (C-I-P of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (Continuation of application) US 20018672 62 A 20010529 (Local application)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12P-21/06(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00 (B) C12P-21/06(B)

Original US Class (secondary): 4356 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: A directed evolution process comprising novel methods for generating improved progeny molecules having desirable properties, including, for example, a method for rapid and facilitated production from a parental polynucleotide template, of a set of mutagenized progeny polynucleotides wherein at least one codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original codon position. This method, termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, is preferably based on the use of the degenerate N,N,G/T sequence. Also, a method of producing from a parental polypeptide template, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid

position. Also, other mutagenization processes that can be used in combination with, or in lieu of, saturation mutagenesis, including, for example: (a) assembly and/or reassembly of polynucleotide building blocks, which building blocks can be sections of genes /or of gene families; and (b) introduction of two or more related polynucleotides into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also, vector and expression vehicles including such polynucleotides and correspondingly expressed polypeptides. Also molecular property screening methods, including a preferred method, termed end selection, comprised of using an enzyme, such as a topoisomerase, a restriction endonuclease, /or a nicking enzyme (such as N. BstNB I), to detect a specific terminal sequence in a working polynucleotide, to produce a ligatable end thereat, and to ligate and clone the working polynucleotide.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method for producing and isolating a polypeptide having at least one desirable property comprised of the steps of: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide set to a mutagenesis process so as to produce a progeny polynucleotide set; and \* (b) subjecting the progeny polynucleotide set to an end selection-based screening and enrichment process, so as to select for a desirable subset of the progeny polynucleotide set.|US 20020142394 A1 (Update 200267 E)

Publication Date: 20021003

\*\*Exonuclease-mediated gene assembly in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, US (DIVE- N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: HALE AND D ORR LLP, 300 PARK AVENUE, NEW YORK, NY, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (Continuation of application) US 200287426 A 2 0020301 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (Continuation of patent)

Original IPC: C07H-21/04(A) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12P-21/06(B)

Current IPC: C07H-21/04(A) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12P-21/06(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: A directed evolution process comprising novel methods for generating improved progeny molecules having desirable properties, including, for example, a method for rapid and facilitated production from a parental polynucleotide template, of a set of mutagenized progeny polynucleotides wherein at least one codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original codon position. This method, termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, is preferably based on the use of the degenerate N,N,G/T sequence. Also, a method of producing from a parental polypeptide template, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. Also, other mutagenization processes that can be used in combination with, or in lieu of, saturation mutagenesis, including, for example: (a) assembly and/or reassembly of polynucleotide building blocks (including sections of genes /or of gene families) mediated by a source of exonuclease activity such as exonuclease III; and (b) introduction of two or more related polynucleotides into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also, molecular property screening methods, including a preferred method, termed end selection, comprised of using an enzyme, such as a topoisomerase, a restriction endonuclease, /or a nicking enzyme (such as N. BstNB I), to detect a specific terminal sequence in a working polynucleotide, to produce a ligatable end thereat, and to ligate and clone the working polynucleotide.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method for producing and isolating a polypeptide having at least one desirable property comprised of the steps of: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide

set to an exonuclease-mediated recombination process so as to produce a progeny polynucleotide set; and \* (b) subjecting the progeny polynucleotide set to an end selection-based screening and enrichment process, so as to select for a desirable subset of the progeny polynucleotide set; \* whereby the above steps can be performed iteratively and in any order and in combination, \* whereby the end selection-based process creates ligation-compatible ends, whereby the creation of ligation-compatible ends is optionally used to facilitate one \* or more intermolecular ligations, that are preferably directional ligations, \* within members of the progeny polynucleotide set so as to achieve \* assembly /or reassembly mutagenesis, \* whereby the creation of ligation-compatible ends serves to facilitate ligation of the progeny polynucleotide set into an expression vector system and expression cloning, \* whereby the expression cloning of the progeny polynucleotide set serves to generate a polypeptide set, \* whereby the generated polypeptide set can be subjected to an expression screening process, and \* whereby expression screening of the progeny polypeptide set provides a means to identify a desirable species, e.g. a mutant polypeptide or alternatively a polypeptide fragment, that has a desirable property, such as a specific enzymatic activity.|US 20020146762 A1 (Update 20 0269 E)

Publication Date: 20021010

\*\*End selection in directed evolution\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I) Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US (FREY-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US

Agent : GARY CARY WARE FRIENDENRICH LLP, 4365 EXECUTIVE DRIVE, SUITE 1600, SAN DIEGO, CA, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 ( Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205  
(Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 19992461 78 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 ( C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (Continuation of application) US 2001885551 A 20010619 (Local application)

Original IPC: C12P-21/02(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12N-15/00(B) C12P-21/04(B) C12P-21/06(B) C12Q-1/70(B) G01N-33/53(B)

Current IPC: C12P-21/02 (A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12N-15/00 (B) C12P-21/04(B) C12P-21/06(B) C12Q-1/70(B) G01N-33/53(B)

Original U S Class (secondary): 43569.1 435440 4355 43569.7 4357.6 530350 53623. 2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of end-selection-based methods is the ability to recover full-length polynucleotides from a library of progeny molecules generated by mutagenesis methods. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly (TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors, can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: What is claimed is: 1. \*\*1\*\*. A method of producing mutagenized polypeptides containing a selectable feature comprising the steps of: \* a) mutagenizing polypeptides containing a selectable feature to produce diversely mutagenized polypeptides; \* b) selecting from the diversely mutagenized polypeptides those containing the selectable feature; and, \* thereby producing the mutagenized

polypeptides containing the selecta ble feature.|US 20020155489 A1 (Update 200273 E)

Publication Date: 2 0021024

\*\*Method for screening enzyme activity\*\*

Assignee: Diversa Co rporation, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: GARY CARY WARE FRIENDENRICH LLP, 4365 EXECUTIVE DRIVE, SUI TE 1600, SAN DIEGO, CA, US

Language: EN

Application: US 19958317 P 19 951207 (Related to Provisional) US 1996692002 A 19960802 (C-I-P of application) US 1997944795 A 19971006 (Division of application) US 1999 421970 A 19991020 (Continuation of application) US 2002121145 A 20020 409 (Local application)

Related Publication: US 6030779 A (Division of patent) US 6054267 A (C-I-P of patent) US 6368798 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C07H-21/04(B)

Current IPC: C1 2Q-1/68(A) C07H-21/04(B)

Original US Class (secondary): 4356 53623.7

Original Abstract: Disclosed is a process for identifying clones having a specified enzyme activity by screening for the specified enzyme activity in a library of clones prepared by (i) selectively isolating target nucleic acid from nucleic acid derived from at least one microorganism, by use of at least one polynucleotide probe comprising at least a portion of a nucleic acid sequence encoding an enzyme having the specified enzyme activity; and (ii) transforming a host with isolated target nucleic acid to produce a library of clones which are screened for the specified enzyme activity.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method for making a library containing a plurality of clones, each clone containing a cDNA or genomic DNA fragment obtained from a population of uncultivated microorganisms.|US 20020164580 A1 (Update 200 275 E)

Publication Date: 20021107

\*\*Combinatorial screening of mixed populations of organisms\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: HAL E AND DORR, LLP, 60 STATE STREET, BOSTON, MA

Language: EN

Application: US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 1996052 2 (Continuation of application) US 1999375605 A 19990817 (C-I-P of application) US 2000663620 A 20000915 (Division of application) US 20029524 6 A 20020311 (Local application)

Related Publication: US 5939250 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12Q-1/00(A) C12Q-1/68(B)

Current IPC: C12Q-1/00(A) C12Q-1/68(B)

Original US Class (secondary): 4354 4356

Original Abstract: Provided is a method of screening gene libraries derived from a mixed population of organisms for a bioactivity or biomolecule of interest. The mixed population of organisms can be a cultured population or an uncultured population from, for example, the environment . Also provided are methods of screening isolates or enriched populations of organisms, which isolates include a population that is spatially, temporally, or hierarchical, for example, of a particular species, genus, family, or class of organisms. Identified clones containing a biomolecule or bioactivity of interest can be further variegated or the DNA contained in the clone can be variegated to create novel biomolecules or bioactivities of interest.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method of discovering bioactivity or a biomolecule of interest comprising: \* collecting samples containing organisms from a diverse set of environments; \* recovering nucleic acid molecules from the organisms; \* obtaining one or more proteins from the recovered nucleic acid molecules; \* screening one or more of the obtained proteins for a bioactivity or biomolecule of interest; \* if a screened protein exhibits the bioactivity or biomolecule of interest but does

not exhibit a desired characteristic, employing one or more evolution technologies to attempt to cause the protein to exhibit the desired characteristic.|US 20020187489 A1 (Update 200301 E)

Publication Date: 20021212

\*\*Method for screening for enzyme activity\*\*

Assignee: Diversa Corporation, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: GARY CARY WARE FRIENDENRICH LLP, 4365 EXECUTIVE DRIVE, SUITE 1600, SAN DIEGO, CA, US

Language: EN

Application: US 19958317 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996692002 A 19960802

(Continuation of application) US 2000557276 A 20000424 (Continuation of application) US

200272499 A 20020205 (Local application)

Related Publication: US 6054267 A (Continuation of patent) US 6344328 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C07H-21/04(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A) C07H-21/04(B)

Original US Class (secondary): 4356 53625.4

Original Abstract: Disclosed is a process for identifying clones having a specified enzyme activity by screening for the specified enzyme activity in a library of clones prepared by (i) selectively isolating target DNA from DNA derived from at least one micro organism, by use of at least one probe DNA comprising at least a portion of a DNA sequence encoding an enzyme having the specified enzyme activity; and (ii) transforming a host with isolated target DNA to produce a library of clones which are screened for the specified enzyme activity.

Claim: What is claimed is: 1. \*\*1\*\*. A method for enriching for DNA sequences containing at least a partial coding region for at least one specified protein activity in a DNA sample comprising selecting and recovering a mixture of target DNA from a mixture of organisms, by use of a mixture of DNA probes comprising at least a portion of a DNA sequence encoding at least one protein having a specified protein activity.|US 20030036116 A1 (Update 200316 E)

Publication Date: 20030220

\*\*Exonuclease-mediated nucleic acid reassembly in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: JANE M. LOVE, P H.D., HALE AND DORR LLP, 300 PARK AVENUE, NEW YORK, NY, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (C-I-P of application) US 2000535754 A 20000327 (Continuation of application) US 2002108077 A 20020326 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (C-I-P of patent) US 6361974 A (Continuation of patent)

Original IPC: C07H-21/04(A) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12P-21/06(B)

Current IPC: C07H-21/04(A) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12P-21/06(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of exonuclease-mediated reassembly methods is the ability to reassemble nucleic

acid strands that would otherwise be problematic to chimerize. Exonuclease-mediated reassembly methods can be used in combination with other mutagenesis methods provided herein. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis (TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method for producing a mutagenized progeny polynucleotide, comprising: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide set to an in vitro exonuclease-mediated reassembly process so as to produce a progeny polynucleotide set; \* whereby the exonuclease-mediated reassembly process is exemplified, in a non-limiting fashion, by subjection to a 3prime exonuclease treatment, such as treatment with exonuclease III, which acts on 3prime underhangs and blunt ends, to liberate 3prime-terminal but not 5prime-terminal nucleotides from a starting double stranded polynucleotide, leaving a remaining strand that is partially or completely free of its original partner so that, if desired, the remaining strand may be used to achieve hybridization to another partner; \* whereby the exonuclease-mediated reassembly process is further exemplified, in a non-limiting fashion, by subjection to a 5prime exonuclease treatment, such as treatment with red alpha gene product, that acts on 5prime underhangs to liberate 5prime-terminal nucleotides from a starting double stranded polynucleotide, leaving a remaining strand that is partially or completely free of its original partner so that, if desired, the remaining strand may be used to achieve hybridization to another partner; \* whereby the exonuclease-mediated reassembly process is further exemplified, in a non-limiting fashion, by subjection to an exonuclease treatment, such as treatment with Mung Bean Nuclease or treatment with S1Nuclease or treatment with ~E.coli ~DNA Polymerase, that acts on overhanging ends, including on unhybridized ends, to liberate terminal nucleotides from an unhybridized single-stranded end of a non-annealed nucleic acid strand in a heteromeric nucleic acid complex, leaving a shortened but hybridized end to facilitate polymerase-based extension and/or ligase-mediated ligation of the treated end; \* and whereby the exonuclease-mediated reassembly process is also exemplified by a dual treatment, that can be performed, for example, non-simultaneously, with both an exonuclease that liberates terminal nucleotides from underhanging ends or blunt ends as well as an exonuclease that liberates terminal nucleotides from overhanging ends such as unhybridized ends.|US 20030073165 A1 (Update 200329 E)

Publication Date: 20030417

\*\*Directed evolution of thermophilic enzyme s\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: HALE AND DORR LLP, 300 PARK AVENUE, NEW YORK, NY, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205

(Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (Continuation of application) US 200139293

A 20011231 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 6335179 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/02(A) C12N-5/04(B) C12N-9/00(B) C12N-15/00(B) C12N-15/70(B) C12N-15/74(B) C12N-15/85(B) C12N-15/87(B) C12P-21/06(B)

Current IPC: C12P-21/02(A) C12N-5/04(B) C12N-9/00(B) C12N-15/00(B) C12N-15/70(B) C12N-15/74(B) C12N-15/85(B) C12N-15/87(B) C12P-21/06(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 435455 435183 435320.1 435419

Original Abstract: Thermostable enzymes are subjected to mutagenesis to produce a thermophilic

enzyme which is stable at thermophilic temperature and which has increased activities at least two-fold higher than the activity of the wild-type thermostable enzyme at lower temperatures, which are temperatures of 50(deg) C. or lower.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A process for providing a thermostable enzyme having improved enzyme activities at lower temperatures, said enzyme being a member selected from the group consisting of an enzyme or a polynucleotide encoding said enzyme comprising: \* (a) subjecting to mutagenesis at least one enzyme which is stable at a temperature of at least 60(deg) C.; and \* (b) screening mutants produced in (a) for a mutated enzyme or polynucleotide encoding a mutated enzyme, which mutated enzyme is stable at a temperature of at least 60(deg) C. and which has an enzyme activity at a temperature at least 10(deg) C. below its optimal temperature range and which has activity greater than the enzyme of step (a).|US 20030175887 A1 (Update 200362 E)

Publication Date: 20030918

\*\*Saturat ion mutagenesis in directed evolution\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe , CA, US

Agent: HALE AND DORR LLP, 300 PARK AVENUE, NEW YORK, NY, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (C-I-P of application) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (C-I-P of application) US 1998185 373 A 19981103 (Continuation of application) US 1999246178 A 19990204 (Continuation of application) US 2001756459 A 20010108 (Continuation of application) US 2002309587 A 20021204 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (C-I-P of patent) US 5939250 A (C-I-P of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (Continuation of patent) US 6335179 A (Continuation of patent) US 6562594 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/02(A) C12N-5/00(B) C12N-5/0 2(B) C12N-5/06(B) C12N-15/63(B) C12N-15/85(B) C12N-15/87(B) C12P-21/0 6(B)

Current IPC: C12P-21/02(A) C12N-5/00(B) C12N-5/02(B) C12N-5/06(B ) C12N-15/63(B) C12N-15/85 (B) C12N-15/87(B) C12P-21/06(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 435455 435325

Original Abstract: Disclosed is a rapid and facilitated method of producing from a parental template polynucleotide, a set of mutagenized progeny polynucleotides whereby at each original codon position there is produced at least one substitute codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids. Accordingly, there is also provided a method of producing from a parental template polypeptide, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. The method provided is termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, and can be used in combination with other mutagenization processes, such as, for example, a process wherein two or more related polynucleotides are introduced into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also provided are vector and expression vehicles including such polynucleotides, polypeptides expressed by the hybrid polynucleotides and a method for screening for hybrid polypeptides.

Claim: What is claimed is : 1.\*\*1\*\*. A method for producing a set of progeny polypeptides from a template polypeptide, wherein the progeny polypeptides contain a non-stochastic range of single amino acid substitutions represented at each amino acid position, the method comprising: \* a) subjecting a codon-containing template polynucleotide to polymerase-based amplification using a 64-fold degenerate oligonucleotide for each codon to be mutagenized, wherein each of said 64-fold degenerate oligonucleotides is comprised of a first homologous sequence and a degenerate N,N,N triplet sequence, so as to generate a set of progeny polynucleotides; and \* b) subjecting said set of progeny polynucleotides to clonal amplification such that polypeptides encoded by the progeny polynucleotides

are expressed; \* whereby, said method provides a means for generating all 20 amino acid changes at each amino acid site along a parental polypeptide template.|US 20030194763 A1 (Update 200369 E)  
Publication Date: 20031016

\* \*\*End selection in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US

Agent: HALE AND DORR LLP, 300 PARK AVENUE, NEW YORK, NY, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional ) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (Continuation of application) US 200299816 A 20020314 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (Continuation of patent) US 6479258 A (C-I-P of patent) Original IPC: A61K-31/00(A) A01N-61/00(B) C07H-21/02(B) C07H-21/04 (B) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12N-1/08(B) C12N-1/20(B) C12N-5/00(B) C12N-5/02(B) C12N-9/00(B) C12N-15/00(B) C12N-15/09(B) C12N-15/63(B) C12N-15/70(B) C12N-15/74(B) C12P-19/34(B) C12P-21/06(B) C12Q-1/68(B) G01N-33/53(B) G01N-33/566(B)

Current IPC: A61K-31/00(A) A01N-61/00(B) C07H-21/02(B) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B) C07K-14/00(B) C07K-17/00(B) C12N-1/08(B) C12N-1/20(B) C12N-5/00(B) C12N-5/02(B) C12N-9/00(B) C12N-15/00(B) C12N-15/09(B) C12N-15/63(B) C12N-15/70(B) C12N-15/74(B) C12P-19/34(B) C12P-21/06(B) C12Q-1/68(B) G01N-33/53(B) G01N-33/566(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 53623.2 530350 43 56 43591.1 43591.2 435183 4357.1 435325 435252.3 435320.1 435270 4365 01 5141 53623.1 53623.4 53623.5 53624.33

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of end-selection-based methods is the ability to recover full-length polynucleotides from a library of progeny molecules generated by mutagenesis methods. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical/or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: 1.\*\*1\*\*. A method for producing and isolating a polypeptide having at least one desirable property comprised of the steps of: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide set to a mutagenesis process so as to produce a progeny polynucleotide set; and \* (b) subjecting the progeny polynucleotide set to an end selection-based screening and enrichment process, so as to select for a desirable subset of the progeny polynucleotide set; \* whereby the above steps can be performed iteratively and in any order and in combination, \* whereby the end selection-based process creates ligation-compatible ends, \* whereby the creation of ligation-compatible ends is optionally used to facilitate one or more intermolecular ligations, that are preferably directional ligations, within members of the progeny polynucleotide set so as to achieve assembly/or reassembly mutagenesis, \* whereby the

creation of ligation-compatible ends serves to facilitate ligation of the progeny polynucleotide set into an expression vector system and expression cloning, \* whereby the expression cloning of the progeny polynucleotide set serves to generate a polypeptide set, \* whereby the generated polypeptide set can be subjected to an expression screening process, and \* whereby expression screening of the progeny polypeptide set provides a means to identify a desirable species, e.g. a mutant polypeptide or alternatively a polypeptide fragment, that has a desirable property, such as a specific enzymatic activity.|US 20030207287 A1 (Update 20 0374 E)

Publication Date: 20031106

\*\*Non-stochastic generation of genetic vaccines\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: HALE AND DORR LLP, 300 PARK AVENUE, NEW YORK, NY, US

Language: EN

Application : US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (Continuation of application) US 2002223507 A 20020819 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6479258 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) A01H-1/00(B) A01H-5/00(B) A01N-43/04(B) A61K-31/70(B) A61K-48/00(B) C12N-5/00(B) C12N-5/02(B) C12N-5/06(B) C12N-15/00(B) C12N-15/09(B) C12N-15/63(B) C12N-15/70(B) C12N-15/74(B) C12N-15/82(B) C12N-15/87(B) C12P-21/02(B) C12P-21/06(B)

Current IPC: C12Q-1/68( A) A01H-1/00(B) A01H-5/00(B) A01N-43/04(B) A61K-31/70(B) A61K-48/00(B ) C12N-5/00(B) C12N-5/02(B) C12N-5/06(B) C12N-15/00(B) C12N-15/09(B) C12N-15/63(B) C12N-15/70(B) C12N-15/74(B) C12N-15/82(B) C12N-15/87(B) C12P-21/02(B) C12P-21/06(B)

Original US Class (secondary): 4356 4356 9.1 435320.1 435325 51444 800288

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining vaccines by use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). Through use of the claimed methods, vectors can be obtained which exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method for obtaining an immunomodulatory polynucleotide that has an optimized modulatory effect on an immune response, or encodes a polypeptide that has an optimized modulatory effect on an immune response, the method comprising: \* creating a library of non-stochastically generated progeny polynucleotides from a parental polynucleotide set; \* wherein optimization can thus be achieved using one or more of the directed evolution methods as described herein in any combination, permutation and iterative manner; \* whereby these directed evolution methods include the introduction of mutations by non-stochastic methods, including by "gene site saturation mutagenesis" as described herein; \* and whereby these directed evolution methods also include the introduction mutations by non-stochastic polynucleotide reassembly methods as described herein; including by synthetic ligation polynucleotide reassembly as described herein.|US 20030215883 A1 (Update 200377 E)

Publication Date: 20031120

\*\*Altered thermostability of enzymes\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: HALE AND DORR LLP, 300 PARK A VENUE, NEW YORK, NY, US

Language: EN

Application: US 19958316 P 19951 207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (Continuation o f application) US 1999375605 A 19990817 (C-I-P of application) US 200 0535754 A 20000327 (C-I-P of application) US 2000663620 A 20000915 (C ontinuation of application) US 2000714780 A 20001115 (Continuation of application) US 2003458523 A 20030609 (Local application)

Related Publication: US 5939250 A (Continuation of patent) US 6361974 A (C-I- P of patent)

Original IPC: G01N-33/53(A) C12N-9/02(B) C12N-9/10(B) C1 2N-9/12(B) C12N-9/16(B) C12N-9/20 (B) G01N-33/48(B) G01N-33/50(B) G06F -19/00(B)

Current IPC: G01N-33/53(A) C12N-9/02(B) C12N-9/10(B) C12N-9 /12(B) C12N-9/16(B) C12N-9/20 (B) G01N-33/48(B) G01N-33/50(B) G06F-19/ 00(B)

Original US Class (secondary): 4357.1 43569.1 435189 435193 435 194 435196 435198 70219

Original Abstract: Provided is a method of screening gene libraries derived from a mixed population of organisms for a bioactivity or biomolecule of interest. The mixed population of organisms can be a cultured population or an uncultured population from, for example, the environment. Also provided are methods of screening isolates or enriched populations of organisms, which isolates include a population that is spatially, temporally, or hierarchical, for example, of a particular species, genus, family, or class of organisms. Identified clones containing a biomolecule or bioactivity of interest can be further variegated or the DNA contained in the clone can be variegated to create novel biomolecules or bioactivities of interest.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A method for obtaining a bioactive protein having a thermostability that is altered as compared to that of the corresponding wild-type protein, comprising: \* a) variegating a nucleic acid sequence encoding the wild-type protein ; and \* b) comparing the bioactivity after variegation with the bioactivity o f the wild-type protein, wherein a difference in the bioactivity is indicative of an effect of sequence variegation, thereby providing the a bioactive protein having a thermostability that is altered as comp ared to that of the corresponding wild-type protein.|US 20040152077 A1 (Update 200452 E)

Publication Date: 20040805

\*\*EXONUCLEASE-MEDIATE D NUCLEIC ACID REASSEMBLY IN DIRECTED EVOLUTION\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I) Djavakhishvili, Tsotne David, San Diego, CA, US (DJAV-I) Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US (F REY-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Djavakhishvili, Tsotne David, San Diego, CA, US Frey, Gerhard Johann, San Diego, C A, US

Agent: DIVERSA CORPORATION, 4955 DIRECTORS PLACE, SAN DIEGO, CA , US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Pro visional) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1 998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application ) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 199 90614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of appli cation) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (C-I-P of application) US 2000535754 A 20000327 (Continua tion of application) US 200129221 A 20011221 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I -P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (C-I-P of patent) US 6361974 A (Continuation of patent) US 6479258 A (C-I-P of patent) US 6537776 A (C-I-P of patent) US 6713279 A (C-I-P of pa tent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Current IPC: C12Q-1/68 (A) C12P-19/34(B)

Original US Class (secondary): 4356 43591.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded

polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of exonuclease-mediated reassembly methods is the ability to reassemble nucleic acid strands that would otherwise be problematic to chimerize. Exonuclease-mediated reassembly methods can be used in combination with other mutagenesis methods provided herein. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis (TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmaceuticals, and transgenic traits.

Claim: 1.\*\*\*1\*\*\*. A method for generating a mutagenized polynucleotide comprising : \* a) annealing a poly-binding nucleic acid strand to two or more mono-binding nucleic acid strands to generate an annealed heteromeric complex of nucleic acid strands; \* b) subjecting unhybridized single-stranded ends of the annealed mono-binding nucleic acid strands in the heteromeric complex to an exonuclease treatment that degrades said unhybridized ends; and \* c) subjecting the annealed heteromeric complex to polymerase-based extension.|US 20040248143 A1 (Update 200481 E)

Publication Date: 20041209

\*\*Exonuclease-mediated nucleic acid reassembly in directed evolution\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: DIVERSA CORPORATION, 4955 DIRECTORS PLACE, SAN DIEGO, CA, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (C-I-P of application) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1997962504 A 19971031 (C-I-P of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (C-I-P of application) US 2000535754 A 20000327 (Continuation of application) US 2002108077 A 20020326 (Continuation of application) US 2003631544 A 20030730 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5939250 A (C-I-P of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (C-I-P of patent) US 6361974 A (Continuation of patent) US 6479258 A (C-I-P of patent) US 6489145 A (C-I-P of patent) US 6537776 A (C-I-P of patent) US 6635449 A (Continuation of patent) US 6713279 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Original US Class (secondary): 4356 43591.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of exonuclease-mediated reassembly methods is the ability to reassemble nucleic acid strands that would otherwise be problematic to chimerize. Exonuclease-mediated reassembly methods can be used in combination with other mutagenesis methods provided herein. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis

(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical / or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmaceuticals, and transgenic traits.

Claim: 1.\*\*1\*\*. (canceled) 2.\*\*2\*\*. A method of recombining an oligonucleotide set, the method comprising: \* aligning a plurality of homologous nucleic acid sequences to identify one or more regions of sequence heterogeneity; \* synthesizing a plurality of different oligonucleotide member types which correspond to one of the regions of heterogeneity; \* mixing the plurality of different oligonucleotide member types, thereby providing a set of oligonucleotides which comprise a plurality of different oligonucleotide members which comprise at least one region of sequence heterogeneity which corresponds to one or more of the regions of heterogeneity in the plurality of homologous nucleic acid sequences; and, \* recombining one or more member of the oligonucleotide set with one or more nucleic acid corresponding to one or more of the homologous nucleic acid sequences.|US 20050009080 A1 (Update 200506 E)

Publication Date: 20050113

\*\*Production of enzymes having desired activities by mutagenesis\*\*

Assignee: Short, Jay M., Encinitas, CA, US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Agent: DIVERSA CORPORATION, 4955 DIRECTORS PLACE, SAN DIEGO, CA, US

Language: EN

Application: US 1 9958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522

(Continuation of application) US 1999375605 A 19990817 (Continuation of application) US

2004912465 A 20040804 (Local application)

Related Publication: US 5939250 A (Continuation of patent) US 6790605 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C12N-9/00(B) C12N-9/26(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A) C12N-9/00(B) C12N-9/26(B)

Original US Class (secondary): 4356 435183

Original Abstract: Disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity derived from a heterogeneous DNA population by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from the heterogeneous DNA population which have been exposed to directed mutagenesis towards production of the specified enzyme activity. Also disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from a pool of DNA populations which have been exposed to directed mutagenesis in an attempt to produce in the library of clones DNA encoding an enzyme having one or more desired characteristics which can be the same or different from the specified enzyme activity.

Claim: What is claimed is: 1.\*\*1\*\*. A process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity derived from a heterogeneous DNA population, which process comprises: \* screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from the heterogeneous DNA population which have been exposed to directed mutagenesis towards production of the specified enzyme activity.|US 20050100985 A1 (Update 200532 E)

Publication Date: 20050512

\*\*Saturation mutagenesis in directed evolution\*\*

Assignee: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Residence: US Nationality: US (SHOR-I)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Residence: US Nationality: US

Agent: DIVERSA CORPORATION, 4955 DIRECTORS PLACE, SAN DIEGO, CA, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (C-I-P of application) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (C-I-P of application) US 1997962504 A 19971031 (C-I-P of application) US 1998185373 A 19981103 (Continuation of application) US 1999246178 A 19990204 (Continuation of application) US 2001756459 A 20010108 (Continuation of application) US 2002309587 A 20021204 (Continuation of application) US 2003644410 A 20030820 (Local application)

Related Publication: US 58 30696 A (C-I-P of patent) US 5939250 A (C-I-P of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (Continuation of patent) US 6335179 A (Continuation of patent) US 6489145 A (C-I-P of patent) US 6562594 A (Continuation of patent) US 6764835 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/02(A) C07K-14/47(B) C12N-5/06(B) C12P-19/34( B)

Current IPC: C12P-21/02(A) C07K-14/47(B) C12N-5/06(B) C12P-19/34(B )

Original US Class (secondary): 43569.1 43591.2 435320.1 435325 5303 50

Original Abstract: Disclosed is a rapid and facilitated method of producing from a parental template polynucleotide, a set of mutagenized progeny polynucleotides whereby at each original codon position there is produced at least one substitute codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids. Accordingly, there is also provided a method of producing from a parental template polypeptide, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. The method provided is termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, and can be used in combination with other mutagenization processes, such as, for example, a process wherein two or more related polynucleotides are introduced into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also provided are vector and expression vehicles including such polynucleotides, polypeptides expressed by the hybrid polynucleotides and a method for screening for hybrid polypeptides.

Claim: 1.\*\*1\*\*. (canceled)|US 5939250 A (Update 199939 E)

Publication Date: 19990817

\*\*Production of enzymes having desired activities by mutagenesis. \*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Agent: Fish Richardson P.C.

Language: EN

Application: US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (Local application)

Original IPC: C12Q-1/00(A) C12N- 9/00(B)

Current IPC: C12Q-1/00(A) C12N-9/00(B)

Original US Class (secondary): 4354 435183 43569.1 53623.1 53623.2

Original Abstract: Disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity derived from a heterogeneous DNA population by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from the heterogeneous DNA population which have been exposed to directed mutagenesis towards production of the specified enzyme activity. Also disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from a pool of DNA populations which have been exposed to directed mutagenesis in an attempt to produce in the library of clones DNA encoding an enzyme having one or more desired characteristics which can be the same or different from the specified enzyme activity.

Claim: 1.A process for obtaining a specified protein or enzymatic activity of interest encoded by DNA contained in a heterogeneous population of microorganisms comprising: \* (a) screening a library containing a plurality of clones containing DNA isolated from a heterogeneous population of

microorganisms for a specified protein or enzymatic activity; \* (b) isolating a clone which is positive for the specified activity; \* (c) introducing at least one mutation into the DNA contained in the clone of (b); \* and \* (d) comparing the activity of a DNA expression product from (c) with the activity encoded by a non-mutagenized form of the DNA present in (b), wherein a difference in activity is indicative of an effect of introducing at least one mutation, thereby providing the specified protein or enzymatic activity of interest.|US 5962283 A (Update 199948 E)

Publication Date: 19991005

\*\*Transaminases and aminotransferases.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Swanson, Ronald V., Media, PA, US Warren, Patrick V., Philadelphia, PA, US

Agent: Fish Richardson P.C.

Language: EN

Application: US 199583 16 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996599171 A 19960209 (C-I-P of application) US 1996646590 A 19960508 (Local application)

Related Publication: US 5814473 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-13/00(A) C07H-21/04(B) C12N-1/00(B) C12N-9/10(B)

Current IPC: C12P-13/00 (A) C07H-21/04(B) C12N-1/00(B) C12N-9/10(B)

Original US Class (secondary): 435128 435193 435252.3 435320.1 435822 53623.2

Original Abstract: Thermostable transaminase and aminotransferase enzymes derived from various ammonifex, aquifex and pyrobaculum organisms are disclosed. The enzymes are produced from native or recombinant host cells and can be utilized in the pharmaceutical, agricultural and other industries.

Claim: 1. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of: \* a) a polynucleotide encoding SEQ ID NOs: 36 or 40; and \* b) a nucleic acid sequence fully complementary to a).|US 6030779 A ( Update 200018 E)

Publication Date: 20000229

\*\*Screening for novel bio activities.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE- N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Agent: Gray, Cary, Ware Freidenrich, LLP Ha

Language: EN

Application: US 1995503606 A 19950 718 (C-I-P of application) US 19958317 P 19951207 (Related to Provisional) US 1995568994 A 19951207 (C-I-P of application) US 1996657409 A 19960603 (C-I-P of application) US 1996692002 A 19960802 (C-I-P of application) US 1997944795 A 19971006 (Local application)

Related Publication: US 5958672 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Original US Class (secondary): 4356 43591.2

Original Abstract: Disclosed is a process for identifying clones having a specified enzyme activity by screening for the specified enzyme activity in a library of clones prepared by (i) selectively isolating target nucleic acid from nucleic acid derived from at least one microorganism, by use of at least one polynucleotide probe comprising at least a portion of a nucleic acid sequence encoding an enzyme having the specified enzyme activity; and (ii) transforming a host with isolated target nucleic acid to produce a library of clones which are screened for the specified enzyme activity.

Claim: 1. A method for identifying a desired activity encoded by a genomic DNA population comprising: \* (a) obtaining a single-stranded genomic DNA population; \* (b) contacting the single-stranded DNA population of (a) with a DNA probe under conditions and for sufficient time to allow hybridization and to produce a double-stranded complex of probe and members of the genomic DNA population which hybridize thereto; \* (c) separating the complex from the single-stranded DNA population of (b); \* (d) releasing from the probe the members of the genomic population which had been bound to the probe; \* (e) forming double-stranded DNA from the members of the genomic popul

ation of (d); \* (f) introducing the double-stranded DNA of (e) into a suitable host cell to produce an expression library containing a plurality of clones containing the selected DNA; and \* (g) screening the expression library for the desired activity.|US 60 54267 A (Update 200027 E)

Publication Date: 20000425

\*\*Method for screening for enzyme activity.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinias, CA, US

Agent: Fisher Richardson P.C.

Language: EN

Application: US 19958317 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996692002 A 19960802 (Local application )

Original IPC: C12Q-1/68(A) C12P-21/00(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A) C12P-21/00(B)

Original US Class (secondary): 4356 43569.1

Original Abstract: Disclosed is a process for identifying clones having a specified enzyme activity by screening for the specified enzyme activity in a library of clones prepared by (i) selectively isolating target DNA from DNA derived from at least one microorganism, by use of at least one probe DNA comprising at least a portion of a DNA sequence encoding an enzyme having the specified enzyme activity; and (ii) transforming a host with isolated target DNA to produce a library of clones which are screened for the specified enzyme activity.

Claim: 1.A method for enriching for DNA sequences containing at least a partial coding region for at least one specified enzyme activity in a DNA sample comprising selecting and recovering a mixture of target DNA from a mixture of organisms, by use of a mixture of DNA probes comprising at least a portion of a DNA sequence encoding at least one enzyme having a specified enzyme activity and transforming host cells with recovered target DNA to produce an expression library of a plurality of clones.|US 6 171820 B1 (Update 200104 E)

Publication Date: 20010109

\*\*Saturation mutagenesis in directed evolution.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Agent: Gary Cary Ware Freidenrich LLP Ha

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (C-I-P of application) US 19966 77112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (C-I-P of application) US 1997962504 A 19971031 (C-I-P of application) US 199 8185373 A 19981103 (Continuation of application) US 1999246178 A 199902 04 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (C-I-P of patent) US 5939250 A (C-I-P of patent) US 5965405 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07K-1/00(B) C12P-21/04(B) G01N-33/53(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07K-1/00(B) C12P-21/04(B) G01N-33/53(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 4357.6 43569.7 530350

Original Abstract : Disclosed is a rapid and facilitated method of producing from a parental template polynucleotide, a set of mutagenized progeny polynucleotides whereby at each original codon position there is produced at least one substitute codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids. Accordingly, there is also provided a method of producing from a parental template polypeptide, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. The method provided is termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, and can be used in combination with other mutagenization processes, such as, for example, a process wherein two or more related polynucleotides are introduced into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination

and reductive reassortment. Also provided are vector and expression vehicles including such polynucleotides, polypeptides expressed by the hybrid polynucleotides and a method for screening for hybrid polypeptides.

Claim: 1. A method for producing a set of progeny polypeptides from a template polypeptide, wherein the progeny polypeptides contain a non-stochastic range of single amino acid substitutions represented at each amino acid position, the method comprising: \* a) subjecting a codon-containing template polynucleotide to polymerase-based amplification using a 64-fold degenerate oligonucleotide for each codon to be mutagenized, wherein each of said 64-fold degenerate oligonucleotides is comprised of a first homologous sequence and a degenerate N,N,N triplet sequence, so as to generate a set of progeny polynucleotides; and \* b) subjecting said set of progeny polynucleotides to clonal amplification such that polypeptides encoded by the progeny polynucleotides are expressed; \* whereby, said method provides a means for generating all 20 amino acid changes at each amino acid site along a parental polypeptide template.]US 6238884 B1 (Update 200132 E)

Publication Date: 20010529

\*\*End selection in directed evolution.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US F rey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US

Agent: Gray Cary Ware Freidenrich LLP Haile; Lisa A.

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951 207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205  
(Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: A directed evolution process comprising novel methods for generating improved progeny molecules having desirable properties, including, for example, a method for rapid and facilitated production from a parental polynucleotide template, of a set of mutagenized progeny polynucleotides wherein at least one codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original codon position. This method, termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, is preferably based on the use of the degenerate N,N,G/T sequence. Also, a method of producing from a parental polypeptide template, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. Also, other mutagenization processes that can be used in combination with, or in lieu of, saturation mutagenesis, including, for example : (a) assembly and/or reassembly of polynucleotide building blocks, which building blocks can be sections of genes /or of gene families; and (b) introduction of two or more related polynucleotides into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also, vector and expression vehicles including such polynucleotides and correspondingly expressed polypeptides. Also molecular property screening methods, including a preferred method, termed end selection, comprised of using an enzyme, such as a topoisomerase, a restriction endonuclease, /or a nicking enzyme (such as N. BstNB I), to detect a specific terminal sequence in a working polynucleotide, to produce a ligatable end thereof, and to ligate and clone the working polynucleotide.

Claim: 1. A method for producing a mutant polynucleotide encoding at least one desirable property, the method comprising: \* (a) subjecting a plurality of first polynucleotides to simultaneous mutagenesis so as to produce a plurality of progeny polynucleotides, wherein the mutagenesis comprises subjecting a codon-containing template polynucleotide to amplification using a degenerate oligonucleotide for each codon to be mutagenized, wherein the degenerate oligonucleotide comprises a first homologous sequence and a degenerate triplet sequence, and \* (b) subjecting the progeny polynucleotides to an end selection-based screening and enrichment process that creates ligation-compatible ends, so as to select

one or more progeny polynucleotides encoding at least one desirable property.|US 6335179 B1 (Update 200207 E)

Publication Date: 20020101

\*\*Directed evolution of thermophilic enzymes.\*\*

As signee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Agent: Gray Cary Ware Freidenrich LLP Haile; Lisa A.

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205

(Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07K-1/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07K-1/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350

Original Abstract: Thermostable enzymes are subjected to mutagenesis to produce a thermophilic enzyme which is stable at thermophilic temperature and which has increased activities at least two-fold higher than the activity of the wild-type thermostable enzyme at lower temperatures, which are temperatures of 50(deg) C. or lower.

Claim: 1.A process for providing a thermostable enzyme having improved enzyme activities as compared to a corresponding wild-type enzyme at lower temperatures comprising: \* (a) subjecting to random mutagenesis at least one polynucleotide encoding an enzyme which is stable at a temperature of at least 60(deg) C.; and \* (b) screening mutants produced in (a) for a mutated enzyme or for a polynucleotide encoding a mutated enzyme, wherein the mutated enzyme is stable at a temperature of at least 60(deg) C. and has increased enzyme activity at a lower temperature than that of the corresponding wild-type enzyme at its optimal temperature.|US 6344328 B1 (Update 200211 E)

Publication Date: 20020205

\*\*Method for screening for enzyme activity.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: Gray Cary Ware Freidenrich Haile; Lisa A.

Language: EN

Application: US 19958317 P 19951207 (Related to Provisional) US 2000557276 A 20000424 (Local application)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Current IPC: C12 Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Original US Class (secondary): 4356 43591.2

Original Abstract: Disclosed is a process for identifying clones having a specified enzyme activity by screening for the specified enzyme activity in a library of clones prepared by (i) selectively isolating target DNA from DNA derived from at least one microorganism, by use of at least one probe DNA comprising at least a portion of a DNA sequence encoding an enzyme having the specified enzyme activity; and (ii) transforming a host with isolated target DNA to produce a library of clones which are screened for the specified enzyme activity.

Claim: 1.A method for enriching for DNA sequences containing at least a partial coding region for at least one specified protein activity in a DNA sample comprising selecting and recovering a mixture of target DNA from a mixture of organisms, by use of a mixture of DNA probes comprising at least a portion of a DNA sequence encoding at least one protein having a specified protein activity.|US 6352842 B1 (Update 200224 E)

Publication Date: 20020305

\*\*Exonuclease-mediated gene assembly in directed evolution.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US Frey, Gerhard J., San Diego, CA, US Djavakhishvili,

Tsotne D., San Diego, CA, US

Agent: Gray Cary Ware F reidenrich LLP Haile; Lisa A. Shen; Greg

Language: EN

Application: US 1 9958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Rel ated to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19 981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of applic ation) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Contin uation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-14/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C0 7K-14/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: A directed evolution process comprising novel methods for generating improved progeny molecules having desirable properties, inc luding, for example, a method for rapid and facilitated production from a parental polynucleotide template, of a set of mutagenized progeny polynucleotides wherein at least one codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original codon position. This method, termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, is preferably based on the use of the degenerate N,N,G/T sequence. Also, a method of producing from a parental polypeptide template, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. Also, other mutagenization processes that can be used in comb ination with, or in lieu of, saturation mutagenesis, including, for exa mple: (a) assembly and/or reassembly of polynucleotide building blocks (including sections of genes /or of gene families) mediated by a source of exonuclease activity such as exonuclease III; and (b) introduction of two or more related polynucleotides into a suitable host cell such t hat a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also molecular property screening methods, including a p referred method, termed end selection, comprised of using an enzyme, su ch as a topoisomerase, a restriction endonuclease, /or a nicking enzyme (such as N. BstNB I), to detect a specific terminal sequence in a work ing polynucleotide, to produce a ligatable end thereat, and to ligate a nd clone the working polynucleotide.

Claim: 1.A method for producing in vitro a plurality of polynucleotides having a t least one desirable property, said method comprising: \* (a) subjecting a plurality of starting or parental polynucleotides to an exonuclease-mediated recombination process so as to produce a plu rality of progeny polynucleotides; and \* (b) subjecting the progeny polynucleotides to an end selection-based screening and enrichment process, so as to select one or more of the progeny polynucleotides having at least one desirable property.[US 6 358709 B1 (Update 200224 E)

Publication Date: 20020319

\*\*End selectio n in directed evolution.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US Frey, Gerh ard Johann, San Diego, CA, US

Agent: Gray Cary Ware Freidenrich LLP Haile; Lisa A.

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Rela ted to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) U S 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 199612 05 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of a pplication) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 199926 7118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I- P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000113 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 596540 8 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-2/06(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00( B)

Current IPC: C12P-2/06(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B)

Original US C lass (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of end-selection-based methods is the ability to recover full-length polynucleotides from a library of progeny molecules generated by mutagenesis methods. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: 1. A method for producing a polynucleotide encoding a polypeptide having at least one desirable property, the method comprising: \* (a) subjecting a plurality of first polynucleotides to simultaneous mutagenesis so as to produce a plurality of progeny polynucleotides; said mutagenesis comprising subjecting a codon-containing template polynucleotide to polymerase-based amplification using a plurality of degenerate oligonucleotides for each codon to be mutagenized, where each of said degenerate oligonucleotides contains a degenerate triplet sequence, so as to generate a plurality of progeny polynucleotides; and \* (b) subjecting the plurality of progeny polynucleotides to end-selection screening to select progeny polynucleotides encoding a polypeptide having at least one desirable property.|US 6361974 B1 (Update 2002 26 E)

Publication Date: 20020326

\*\*Exonuclease-mediated nucleic acid reassembly in directed evolution.\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA , US Djavakhishvili, Tsotne David, San Diego, CA, US

Frey, Gerhard Jo hann, San Diego, CA, US

Agent: Gray Cary Ware Freidenrich Haile; Lisa A. Shen; Greg

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961 205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 19992 67118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I -P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 2000020 4 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (C-I-P of application) US 2000535754 A 20000327 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B)

Current IPC : C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of exonuclease-mediated reassembly methods is the ability to reassemble nucleic acid strands that would otherwise be problematic to chimerize. Exonuclease-mediated reassembly methods can be used in combination with other mutagenesis methods provided herein. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis (TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides

methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: 1. A method for producing a mutagenized progeny polynucleotide, comprising subjecting a starting or parental polynucleotide set to an in vitro exonuclease-mediated reassembly process so as to produce a progeny polynucleotide set.|US 6368798 B1 (Update 200227 E)

Publication Date: 200204 09

\*\*Screening for novel bioactivities.\*\*

Assignee: Diversa Corporation , San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Agent: Gray Cary Ware Freidenrich LLP Haile; Lisa A.

Language: EN

Application: US 19958317 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996692002 A 19960802 (C-I-P of application) US 1997944795 A 19971006 (Division of application) US 1999421970 A 19991020 (Local application)

Related Publication: US 6030779 A (Division of patent) US 6054267 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12Q-1/68(A) C12P-19/34(B)

Current IPC: C12Q-1/68(A ) C12P-19/34(B)

Original US Class (secondary): 4356 43591.2

Original Abstract: Disclosed is a process for identifying clones having a specified enzyme activity by screening for the specified enzyme activity in a library of clones prepared by (i) selectively isolating target nucleic acid from nucleic acid derived from at least one microorganism, by use of at least one polynucleotide probe comprising at least a portion of a nucleic acid sequence encoding an enzyme having the specified enzyme activity; and (ii) transforming a host with isolated target nucleic acid to produce a library of clones which are screened for the specified enzyme activity.

Claim: 1. A method for identifying a desired bioactivity encoded by a genomic DNA population comprising: \* (a) obtaining a single-stranded genomic DNA population; \* (b) contacting the single-stranded DNA population of (a) with at least one DNA probe or a mixture of probes under conditions and for sufficient time to allow hybridization and to produce a double-stranded complex of probe and members of the genomic DNA population which hybridize thereto; \* (c) separating the complex from the single-stranded DNA population of (b); \* (d) releasing from the probe the members of the genomic population which had been bound to the probe; \* (e) forming double-stranded DNA from the members of the genomic population of (d); \* (f) introducing the double-stranded DNA of (e) into a suitable host cell to produce a library containing a plurality of clones containing the selected DNA; and \* (g) screening the library for clones encoding the desired activity.| US 6479258 B1 (Update 200278 E)

Publication Date: 20021112

\*\*Non-stochastic generation of genetic vaccines\*\*

Assignee: Diversa Corporation , San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe , CA, US

Agent: Gray Cary Ware Freidenrich LLP, US Haile, Lisa A., US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205 (C-I-P of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 20004 95052 A 20000131 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C1 2P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-1/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07 H-21/04(B) C07K-1/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining vaccines by use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). Through use of the claimed methods, vectors can be obtained which exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, a ability to tailor an immune response, and the like.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method for obtaining an immunomodulatory polynucleotide that has an optimized modulatory effect on an immune response as compared to the response prior to optimization, or encodes a polypeptide that has an optimized modulatory effect on an immune response as compared to the response prior to optimization, the method comprising: \* creating a library of non-stochastically generated progeny polynucleotides from a parental polynucleotide set, wherein optimization is achieved by at least one directed evolution method in any combination, permutation and iterative manner.|US 6632600 B1 (Update 200368 E)

Publication Date: 20031014

\*\*Altered thermostability of enzymes\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: Love, Jane M., US Hale and Dorr LLP, US

Language: EN

Application: US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (Continuation of application) US 1999375605 A 19990817 (C-I-P of application) US 2000535754 A 2000 0327 (C-I-P of application) US 2000663620 A 20000915 (Continuation of application) US 2000714780 A 20001115 (Local application)

Related Publication: US 5939250 A (Continuation of patent) US 6361974 A (C-I- P of patent)

Original IPC: C12Q-1/00(A)

Current IPC: C12Q-1/00(A)

Original US Class (secondary): 4354 4356 43514 43515 43516 43518 43519 4 3521 43522 43523 43524 43525 43526 43527 43528

Original Abstract: Provided is a method of screening gene libraries derived from a mixed population of organisms for a bioactivity or biomolecule of interest. The mixed population of organisms can be a cultured population or an uncultured population from, for example, the environment. Also provided are methods of screening isolates or enriched populations of organisms, which isolates include a population that is spatially, temporally, or hierarchical, for example, of a particular species, genus, family, or class of organisms. Identified clones containing a biomolecule or bioactivity of interest can be further variegated or the DNA contained in the clone can be variegated to create novel biomolecules or bioactivities of interest.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method for identifying a protein or polypeptide having an altered thermostability compared with a thermostability of a wild-type protein or polypeptide, the method comprising: \* a) constructing a library of clones, wherein the clones are constructed from nucleic acids obtained from an unselected mixed population of organisms from an environmental sample; \* (b) determining thermostability of one or more wild-type proteins or polypeptides expressed from one or more clones of the library; \* (c) subjecting one or more of the clones of (b) to mutagenesis; \* (d) determining thermostability of modified proteins or polypeptides expressed from the clones of (c); \* (e) comparing the thermostability of the one or more wild-type proteins or polypeptides of (b) with the thermostability of at least one corresponding modified protein or polypeptide of (d), thereby identifying one or more clones expressing a modified proteins or polypeptides having an altered thermostability, and; \* (f) selecting at least one protein or polypeptide having an altered thermostability.|US 6635449

B2 (Update 200370 E)

Publication Date: 20 031021

\*\*Exonuclease-mediated nucleic acid reassembly in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: Love, Jane M., US Hale and Dorr LLP, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 1995 1207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 199676048 9 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 ( C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 1999 0326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (C-I-P of application) US 2000535754 A 20000327 (Continuation of application) US 2002108077 A 20020326 (Local application)

Related Publication: US 5 830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335 179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (C-I-P of patent) US 6361974 A (Continuation of patent) US 6479258 A (C-I-P of patent) US 6537776 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C 12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C 07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530 350 53623.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of exonuclease-mediated reassembly methods is the ability to reassemble nucleic acid strands that would otherwise be problematic to chimerize. Exonuclease-mediated reassembly methods can be used in combination with other mutagenesis methods provided herein. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis (TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method for producing a mutagenized progeny polynucleotide, comprising: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide set to an in vitro exonuclease-mediated reassembly process, said exonuclease-mediated reassembly process comprising treatment with an enzyme having a 3prime exonuclease activity, treatment with an enzyme having a 5prime exo nuclease activity, treatment with an enzyme having both a 3prime exonuclease activity and a 5prime exonuclease activity, treatment with an enzyme having nucleic activity, treatment with an enzyme having polymerase activity, or a combination thereof, whereby single-stranded polynucleotide sequences are generated; and \* (b) producing a progeny polynucleotide resulting from hybridization of the single-stranded polynucleotide sequences of (a).|US 6696275 B2 (Update 200415 E)

Publication Date: 20040224

\*\*End selection in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US

Agent: Hale and Dorr, L.L.P., US Love, Jane M., US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205 (C-I-P of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990205 (C-I -P of application) US 1999267118 A 19990309 (Continuation of application) US 2001867262 A 20010529 (Local application)

Related Publication : US 5830696 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (Continuation of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Original US Class (secondary ): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: A directed evolution process comprising novel methods for generating improved progeny molecules having desirable properties, including, for example, a method for rapid and facilitated production from a parental polynucleotide template, of a set of mutagenized progeny polynucleotides wherein at least one codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original codon position. This method, termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, is preferably based on the use of the degenerate N,N,G/T sequence. Also, a method of producing from a parental polypeptide template, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. Also, other mutagenization processes that can be used in combination with, or in lieu of, saturation mutagenesis, including, for example: (a) assembly and/or reassembly of polynucleotide building blocks, which building blocks can be sections of genes /or of gene families; and (b) introduction of two or more related polynucleotides into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also, vector and expression vehicles including such polynucleotides and correspondingly expressed polypeptides. Also molecular property screening methods, including a preferred method, termed end selection, comprised of using an enzyme, such as a topoisomerase, a restriction endonuclease, /or a nicking enzyme (such as N. BstNB I), to detect a specific terminal sequence in a working polynucleotide, to produce a ligatable end thereat, and to ligate and clone the working polynucleotide.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method for producing and isolating a polypeptide having at least one desirable property comprising the steps of: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide set to a mutagenesis process so as to produce a progeny polynucleotide set; and \* (b) subjecting the progeny polynucleotide set to an end selection-based screening and enrichment process, so as to select for a desirable subset of the progeny polynucleotide set which produces a polypeptide having at least one desirable property.|US 6709841 B2 (Update 200421 E)

Publication Date: 20040323

\*\*Exonuclease-mediated gene assembly in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: Love, Jane M., US Hale and Dorr LLP, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (Continuation of application) US 200287426 A 20020301 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: A directed evolution process comprising novel methods for generating improved progeny molecules having desirable properties, including, for example, a method for rapid and fac

ilitated production from a parental polynucleotide template, of a set of mutagenized progeny polynucleotides wherein at least one codon encodes each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original codon position. This method, termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, is preferably based on the use of the degenerate N,N,G/T sequence. Also, a method of producing from a parental polypeptide template, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. Also, other mutagenization processes that can be used in combination with, or in lieu of, saturation mutagenesis, including, for example: (a) assembly and/or reassembly of polynucleotide building blocks (including sections of genes /or of gene families) mediated by a source of exonuclease activity such as exonuclease III; and (b) introduction of two or more related polynucleotides into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also molecular property screening methods, including a preferred method, termed end selection, comprised of using an enzyme, such as a topoisomerase, a restriction endonuclease, /or a nicking enzyme (such as N. BstNB I), to detect a specific terminal sequence in a working polynucleotide, to produce a ligatable end thereat, and to ligate and clone the working polynucleotide.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method of identifying a polypeptide having a desirable property, comprising the steps of: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide set to an exonuclease-mediated recombination process to produce a progeny polynucleotide set; \* (b) subjecting the progeny polynucleotide set to an end selection-based screening and enrichment process to select for a progeny polynucleotide subset, wherein members of the subset have a desirable property ; \* (c) expressing the progeny polynucleotide subset to generate a polypeptide set; and \* (d) screening the polypeptide set to identify a polypeptide having the desirable property.|US 6713279 B1 (Update 200423 E)

Publication Date: 20040330

\*\*Non-stochastic generation of genetic vaccines and enzymes\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Agent: Love, Jane M., US Butler, James E., US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6479253 A (C-I-P of patent) US 6537776 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C12N-5/06(B) C12N-15/00(B) C12Q-1/68(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C12N-5/06(B) C12N-15/00(B) C12Q-1/68(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 4356 435334 435320.1

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmaceuticals, and

transgenic traits.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method of providing an immunomodulatory polynucleotide that has an optimized modulatory effect on an immune response, or encodes a polypeptide that has an optimized modulatory effect on an immune response, the method comprising creating a library of non-stochastically generated progeny polynucleotides from a parental polynucleotide set, thereby providing an immunomodulatory polynucleotide.|US 6713281 B2 (Update 200423 E)

Publication Date: 20040330

\*\*Directed evolution of thermophilic enzymes\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Agent: Love, Jane M., US Hale and Dorr LLP, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205

(Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (Continuation of application) US 200139293 A 20011231 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 6335179 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07K-17/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07K-17/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350

Original Abstract: Thermostable enzymes are subjected to mutagenesis to produce a thermophilic enzyme which is stable at thermophilic temperature and which has increased activities at least two-fold higher than the activity of the wild-type thermostable enzyme at lower temperatures, which are temperatures of 50(deg) C. or lower.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method of producing a thermostable enzyme which is stable at temperatures of at least 60(deg) C. and which exhibits higher activity at a desired lower temperature below 60(deg) C., compared with a corresponding wild-type enzyme at its optimal temperature, comprising: \* (a) isolating nucleic acid from a thermophilic organism, said nucleic acid comprising at least one polynucleotide encoding a desired enzyme which is stable at a temperature of at least 60(deg) C.; \* (b) preparing a library of clones generated from the nucleic acid of step (a); \* (c) mutating the nucleic acid sequence contained in a clone from the library comprising the at least one polynucleotide of step (a); and \* (d) screening mutants produced by the mutating step (c) to identify a mutated enzyme or a polynucleotide encoding a mutated enzyme, wherein the mutated enzyme is stable at a temperature of at least 60(deg) C., and has increased enzyme activity at a lower temperature than the activity of the corresponding wild-type enzyme at its optimal temperature.|US 6713282 B2 (Update 200423 E)

Publication Date: 20040330

\*\*End selection in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US

Agent: Love, Jane M., US Butler, James E., US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205

(Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A

19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (Continuation of application) US

2001495052 A 20010131 (C-I-P of application) US 200299816 A 20020314 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US

6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US

6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (Continuation of patent) US 6479258 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C12Q-1/68(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C12Q-1/68(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 4356

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of end-selection-based methods is the ability to recover full-length polynucleotides from a library of progeny molecules generated by mutagenesis methods. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical / or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method for producing and isolating a polypeptide having at least one desirable property comprised of the steps of: \* (a) subjecting a starting or parental polynucleotide set to a mutagenesis process so as to produce a progeny polynucleotide set; said mutagenesis process comprising subjecting a codon-containing template polynucleotide to a polymerase-based amplification using a plurality of degenerate oligonucleotides for each codon to be mutagenized, where each of said degenerate oligonucleotides contains a degenerate triplet sequence, so as to generate a plurality of progeny polynucleotides, and \* (b) subjecting the progeny polynucleotide set to an end selection-based screening and enrichment process, so as to select for a desirable subset of the progeny polynucleotide set; \* whereby the above steps can be performed iteratively and in any order, combination, and permutation, \* whereby the end selection-based process of step (b) creates ligation-compatible ends, \* whereby the creation of ligation-compatible ends in step (b) is optionally used to facilitate one or more intermolecular ligations, that are preferably directional ligations, within members of the progeny polynucleotide set so as to achieve assembly and/or reassembly mutagenesis, \* whereby the creation of ligation-compatible ends in step (b) serves to facilitate ligation of the progeny polynucleotide set into an expression vector system and expression cloning, \* whereby the expression cloning of the progeny polynucleotide set serves to generate a polypeptide set, \* whereby the generated polypeptide set can be subjected to an expression screening process, and \* whereby expression screening of the progeny polypeptide set provides a means to identify a desirable species.|US 6740506 B2 (Update 200435 E)

Publication Date: 20040525

\*\*End selection in directed evolution \*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor : Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US

Agent: Love, Jane M., US Hale and Dorr LLP, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19961205 (Continuation of application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (Continuation of application) US 2001885551 A 20010619 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07K-17/00(B) C12P-21/04(B) G01N-33/53(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07K-17/00(B) C12P-21/04(B) G01N-33/53(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 43569.7 4357.6 530350

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution(TM)). A particular advantage of end-selection-based methods is the ability to recover full-length polynucleotides from a library of progeny molecules generated by mutagenesis methods. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis(TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReassembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors, can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression, increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method of producing mutagenized polypeptides containing a selectable feature comprising the steps of: \* a) mutagenizing polypeptides containing a selectable feature to produce diversely mutagenized polypeptides; \* b) selecting from the diversely mutagenized polypeptides those containing the selectable feature; and, \* thereby producing the mutagenized polypeptides containing the selectable feature.|US 6764835 B2 (Update 200448 E)

Publication Date: 20040720

\*\*Saturation mutagenesis in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (C-I-P of application) US 1996677112 A 19960709 (C-I-P of application) US 1996760489 A 19961205 (C-I-P of application) US 1998185373 A 19981103 (Continuation of application) US 1999246178 A 19990204 (Continuation of application) US 2001756459 A 20010108 (Continuation of application) US 2002309587 A 20021204 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (C-I-P of patent) US 5939250 A (C-I-P of patent) US 5965408 A (C-I-P of patent) US 6171820 A (Continuation of patent) US 6335179 A (Continuation of patent) US 6562594 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07K-17/00(B) C12P-21/04(B) G01N-33/53(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07K-17/00(B) C12P-21/04(B) G01N-33/53(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 4357.6 43569.7 530350

Original Abstract: Disclosed is a rapid and facilitated method of producing from a parental template polynucleotide, a set of mutagenized progeny polynucleotides whereby at each original codon position there is produced at least one substitute codon encoding each of the 20 naturally encoded amino acids. Accordingly, there is also provided a method of producing from a parental template polypeptide, a set of mutagenized progeny polypeptides wherein each of the 20 naturally encoded amino acids is represented at each original amino acid position. The method provided is termed site-saturation mutagenesis, or simply saturation mutagenesis, and can be used in combination with other mutagenization processes, such as, for example, a process wherein two or more related polynucleotides are introduced into a suitable host cell such that a hybrid polynucleotide is generated by recombination and reductive reassortment. Also provided are vector and expression vehicles including such polynucleotides, polypeptides expressed by the hybrid polynucleotides and a method for screening for hybrid polypeptides.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method for producing a set of progeny polypeptides from a template polynucleotide encoding a parental polypeptide, wherein the progeny polypeptides contain a non-

stochastic range of single codon substitutions represented at each amino acid position comprising: \* subjecting a circular nucleic acid molecule comprising a codon-containing template polynucleotide to a polymerase-based amplification using a 64-fold degenerate oligonucleotide for each codon to be mutagenized, said 64-fold degenerate oligonucleotides comprising a first homologous sequence and a degenerate N,N,N triplet sequence, so as to generate a set of progeny polynucleotides; and \* subjecting said set of progeny polynucleotides to clonal amplification such that progeny polypeptides encoded by the progeny polynucleotides are expressed; \* whereby, said method provides a means for generating at least 19 different amino acid changes at each amino acid site along a parental polypeptide.|US 6790605 B1 (Update 200460 E)

Publication Date: 20040914

\*\*Methods for obtaining a desired bioactivity or biomolecule using DNA libraries from an environmental source\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N)

Inventor: Short, Jay M., Encinitas, CA, US

Language: EN

Application: US 19958316 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996651568 A 19960522 (Continuation of application) US 1999375605 A 19990817 (Local application)

Related Publication: US 59 39250 A (Continuation of patent)

Original IPC: C12Q-1/00(A)

Current IPC: C12Q-1/00(A)

Original US Class (secondary): 4354 4356 43514 43515 43516 43518 43519 43521 43522 43523 43524

Original Abstract: Disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity derived from a heterogeneous DNA population by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from the heterogeneous DNA population which have been exposed to directed mutagenesis towards production of the specified enzyme activity. Also disclosed is a process for obtaining an enzyme having a specified enzyme activity by screening, for the specified enzyme activity, a library of clones containing DNA from a pool of DNA populations which have been exposed to directed mutagenesis in an attempt to produce in the library of clones DNA encoding an enzyme having one or more desired characteristics which can be the same or different from the specified enzyme activity.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method for identifying a protein having a desired activity, the method comprising: \* (a) constructing a DNA library from unselected DNA molecules obtained directly from an environmental source; \* (b) subjecting the library to mutagenesis \* (c) expressing the DNA molecules of the mutagenized library to produce proteins; and \* (d) screening the proteins produced in (c) to identify one or more protein(s) with the desired activity.|US 6939689 B2 (Update 200558 E)

Publication Date: 20050906

\*\*Exonuclease-mediated nucleic acid reassembly in directed evolution\*\*

Assignee: Diversa Corporation, San Diego, CA, US (DIVE-N) Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Residence: US Djavakhishvili, Tsotne David, San Diego, CA, US Residence: US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US Residence: US

Inventor: Short, Jay M., Rancho Santa Fe, CA, US Residence: US Djavakhishvili, Tsotne David, San Diego, CA, US Residence: US Frey, Gerhard Johann, San Diego, CA, US Residence: US

Language: EN

Application: US 19958311 P 19951207 (Related to Provisional) US 1996760489 A 19961205 (Continuation of a application) US 1998185373 A 19981103 (C-I-P of application) US 1999246178 A 19990204 (C-I-P of application) US 1999267118 A 19990309 (C-I-P of application) US 1999276860 A 19990326 (C-I-P of application) US 1999332835 A 19990614 (C-I-P of application) US 2000495052 A 20000131 (C-I-P of application) US 2000498557 A 20000204 (C-I-P of application) US 2000522289 A 20000309 (C-I-P of application) US 2000535754 A 20000327 (Continuation of application) US 200129221 A 20011221 (Local application)

Related Publication: US 5830696 A (Continuation of patent) US 6171820 A (C-I-P of patent) US 6238884 A (C-I-P of patent) US 6335179 A (C-I-P of patent) US 6352842 A (C-I-P of patent) US 6358709 A (C-I-P of patent) US 6361974 A (Continuation of patent) US 64 79258 A (C-I-P of patent) US 6537776 A (C-I-P of patent) US 6713279 A (C-I-P of patent)

Original IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Current IPC: C12P-21/06(A) C07H-21/04(B) C07K-17/00(B)

Original US Class (secondary): 43569.1 530350 53623.2

Original Abstract: This invention provides methods of obtaining novel polynucleotides and encoded polypeptides by the use of non-stochastic methods of directed evolution (DirectEvolution™). A particular advantage of exonuclease-mediated reassembly methods is the ability to reassemble nucleic acid strands that would otherwise be problematic to chimerize. Exonuclease-mediated reassembly methods can be used in combination with other mutagenesis methods provided herein. These methods include non-stochastic polynucleotide site-saturation mutagenesis (Gene Site Saturation Mutagenesis (TM)) and non-stochastic polynucleotide reassembly (GeneReAssembly(TM)). This invention provides methods of obtaining novel enzymes that have optimized physical /or biological properties. Through use of the claimed methods, genetic vaccines, enzymes, small molecules, and other desirable molecules can be evolved towards desirable properties. For example, vaccine vectors can be obtained that exhibit increased efficacy for use as genetic vaccines. Vectors obtained by using the methods can have, for example, enhanced antigen expression , increased uptake into a cell, increased stability in a cell, ability to tailor an immune response, and the like. Furthermore, this invention provides methods of obtaining a variety of novel biologically active molecules, in the fields of antibiotics, pharmacotherapeutics, and transgenic traits.

Claim: 1.1. A method for generating a mutagenized polynucleotide comprising: \* a) annealing a poly-binding nucleic acid strand to two or more mono-binding nucleic acid strands to generate an annealed heteromeric complex of nucleic acid strands, wherein said annealed complex comprises about 10, 100, 1,000, 10,000, 100,000 or 1,000,000 bases; \* b) subjecting unhybridized single-stranded ends of the annealed mono- binding nucleic acid strands in the heteromeric complex to an exonuclease treatment that degrades said unhybridized ends; and \* c) subjecting the annealed heteromeric complex to polymerase-based extension.

## WIPO

Publication Number: WO 1997020918 A1 (Update 199729 B)

Publication Date: 19970612

### \*\*METHOD OF SCREENING FOR ENZYME ACTIVITY\*\*

Assignee: RECOMBINANT BIOCATALYSIS, INC., US (RECO-N)

Inventor: SHORT, JAY, M., US

Language: EN (77 pages, 3 drawings)

Application: WO 1996US19457 A 19961206 (Local application)

Priority: US 19958317 P 19951207 US 19958316 P 19951207 US 19958311 P 19951207 US 1996651568 A 19960522 US 1996692002 A 19960802

Designated States: (National Original) AU CA IL JP (Regional Original) AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

Original IPC: C12N-9/00(A)

Current IPC: C12N-9/00(A)

Original Abstract: Disclosed are processes to identify desired enzymatic activity from a pool of DNA collected from one or more organisms or a DNA subjected to random directed mutagenesis. The methods involve the generation of DNA library in a host cell and screening for the desired activity. The process can be applied to develop thermally stable proteins having improved enzymatic activity at lower temperature.

Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.  
Dialog® File Number 351 Accession Number 8214834

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2000-501606

(P2000-501606A)

(43)公表日 平成12年2月15日 (2000.2.15)

(51)Int.Cl.<sup>1</sup>

C 12 N 15/09  
9/00

識別記号

ZNA

F I

C 12 N 15/00  
9/00

テマコト<sup>®</sup> (参考)

ZNAA

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 68 頁)

(21)出願番号 特願平9-521457  
(86) (22)出願日 平成8年12月6日 (1996.12.6)  
(85)翻訳文提出日 平成10年6月8日 (1998.6.8)  
(86)国際出願番号 PCT/US96/19457  
(87)国際公開番号 WO97/20918  
(87)国際公開日 平成9年6月12日 (1997.6.12)  
(31)優先権主張番号 60/008,311  
(32)優先日 平成7年12月7日 (1995.12.7)  
(33)優先権主張国 米国 (US)  
(31)優先権主張番号 60/008,316  
(32)優先日 平成7年12月7日 (1995.12.7)  
(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 リコンビナントバイオカタリシス, インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州, ラホヤ, コーストポウルヴァードサウス 505  
(72)発明者 ショート, ジェイ, エム.  
アメリカ合衆国 92024 カリフォルニア州, エンシニタス, ディレッジドライブ 320  
(74)代理人 弁理士 平木祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酵素活性をスクリーニングする方法

(57)【要約】

一種以上の生物から回収されたDNAあるいはランダム指向性突然変異誘発にかけられたDNAのプールから所望の酵素活性を同定する方法が開示される。該方法は、宿主細胞内でDNAライブラリーを作製し、所望の活性についてスクリーニングすることを含む。該方法は、低温で改善された酵素活性を有する熱安定性タンパク質を開発することに応用できる。

【特許請求の範囲】

1. 特定の酵素活性を有するクローンを同定するための方法であって、
  - (i) 特定の酵素活性を有するタンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部を含む少なくとも一種の核酸または核酸様ハイブリダイゼーションプローブを使用することにより、少なくとも二種の微生物から得た核酸集団から標的核酸を選択及び回収し、
    - (ii) 回収した標的核酸を用いて宿主を形質転換して、特定の活性についてスクリーニングされる当初の核酸集団のサブセットを含むクローンのライブラリーを作製することにより調製したクローンのライブラリー中で該特定の酵素活性についてスクリーニングすることを含む前記方法。
2. 前記の微生物の核酸から得られる核酸が、
  - 二本鎖核酸を一本鎖核酸に変換し、  
変換された一本鎖核酸から、プローブ核酸にハイブリダイズする標的一本鎖核酸を回収し、  
宿主を形質転換するために回収した標的一本鎖核酸を二本鎖核酸に変換することにより選択される請求項1に記載の方法。
3. 前記プローブを固相に直接または間接的に結合し、これによりそのようにハイブリダイズしない一本鎖核酸からそれを分離する請求項2に記載の方法。
4. 一本鎖核酸を前記プローブから遊離させ、その遊離した一本鎖核酸を二本鎖核酸に変換する前に増幅する工程をさらに含む請求項3に記載の方法。
5. 前記標的核酸が遺伝子クラスターまたはその部分をコードする請求項1に記載の方法。
6. 少なくとも一種の微生物から得られた核酸ライブラリーを選択手順にかけてそこから特定のタンパク質活性を有するタンパク質をコードする核酸配列の全部あるいは一部である一種以上のプローブ核酸配列にハイブリダイズする二本鎖核酸を選択する方法であって、
  - (a) ハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、二本鎖核酸集団を、リガ

ンドに結合した核酸プローブと接触させて、プローブとそれにハイブリダイズする核酸集団のメンバーの複合体を生成させ、

(b) (a)の複合体を前記リガンドの固相特異的結合相手と接触させて、固相複合体を生成させ、

(c) (b)の未結合核酸集団から固相複合体を分離し、

(d) プローブから固相結合プローブに結合した集団のメンバーを遊離させ、

(e) (d)の二本鎖核酸を適当な宿主に導入して、選択された核酸を含む複数のクローンを含むライブラリーを形成し、

(f) 該ライブラリーを特定のタンパク質活性についてスクリーニングすることを含む前記方法。

7. 前記標的核酸が遺伝子クラスターまたはその部分をコードする請求項6に記載の方法。

8. 上記(a)の前に、さらに

(i) 所与のクラスのタンパク質にユニークな(i)のコンセンサス配列に相補的なリガンド結合オリゴヌクレオチドプローブに、ハイブリダイゼーションを可能とする条件下で(a)の二本鎖核酸集団を接触させて二本鎖複合体を形成させ、

(ii) (i)の複合体を該リガンドの固相特異的結合相手と接触させて固相複合体を形成し、

(iii) 該固相複合体を未結合核酸集団から分離し、

(iv) 前記固相結合プローブに結合した集団のメンバーを遊離させ、

(v) 該固相結合プローブをそれに結合した集団のメンバーから分離する工程を含む請求項6に記載の方法。

9. 異種核酸集団に由来する特定のタンパク質活性を有するタンパク質を得るための方法であって、該特定の活性が生じるように改変あるいは突然変異誘発された異種核酸集団からの核酸を含むクローンのライブラリーを、前記特定の酵素活性についてスクリーニングすることを含む方法。

10. 前記突然変異誘発の前に、前記特定の活性と同じであってもよく異なってもよい共通の特徴をコードする核酸配列を含む核酸を異種核酸集団から選択的に回収することをさらに含む請求項9に記載の方法。

11. 核酸調製物の回収が、核酸集団を前記配列の少なくとも部分の特異的結合相手と接触させることを含む請求項10に記載の方法。
12. 特異的結合相手が固相結合ハイブリダイゼーションプローブである請求項11に記載の方法。
13. 前記共通の特徴が酵素活性の一種である請求項10に記載の方法。
14. 前記酵素活性の一種を示す異種核酸集団からの核酸を含むクローンから核酸を回収することを含む請求項13に記載の方法。
15. 前記突然変異誘発が部位指向またはランダム指向突然変異誘発である請求項9に記載の方法。
16. 突然変異誘発にかける前に、前記特定の活性と同じであってもよく異なるものであってもよい活性について前記クローンのライブラリーを予備スクリーニングすることを含む請求項9に記載の方法。
17. 対象となるタンパク質の発現について前記クローンを予備スクリーニングすることを含む請求項16に記載の方法。
18. 特定のタンパク質活性を有するタンパク質を得るための方法であって、その特定のタンパク質活性と同じであってもよく異なるものであってもよい一以上の所望の特徴を有するタンパク質をコードする核酸をクローンのライブラリーで生成する試みにおいて突然変異誘発にかけられた核酸集団のプールからの核酸を含むクローンのライブラリーを、その特異的な活性についてスクリーニングすることを含む前記方法。
19. 前記突然変異誘発の前に、特定のタンパク質活性と同じであってもよく異なるものであってもよい少なくとも1つの共通のタンパク質の特徴をコードする核酸配列を含む核酸を前記異種核酸集団から選択的に回収することをさらに含む請求項18に記載の方法。
20. 前記少なくとも1つの共通の特徴が少なくとも一の通常の酵素活性である請求項19に記載の方法。
21. 核酸調製物の回収が、核酸集団を、前記配列の少なくとも部分の特異的結合相手と接触させることを含む請求項20に記載の方法。
22. 前記特異的結合相手が固相結合ハイブリダイゼーションプローブである請求

項

21に記載の方法。

23. 酵素活性の一種を示す異種核酸集団からの核酸を含むクローンから核酸を回収することを含む請求項22に記載の方法。

24. 前記突然変異誘発が部位指向またはランダム突然変異誘発である請求項18に記載の方法。

25. 低温において改良された酵素活性を有し、酵素からなる群から選択されるメンバーである熱安定性酵素、または該酵素をコードするポリヌクレオチドを提供する方法であって、

(a)少なくとも60°Cの温度で安定な少なくとも一種の酵素を突然変異誘発にかけ、

(b)少なくとも60°Cの温度で安定で、その至適温度範囲の少なくとも10°C低い温度で酵素活性を有し、工程(a)の酵素よりも高い活性を有する突然変異酵素、または突然変異酵素をコードするポリヌクレオチドについて(a)で得られた突然変異体をスクリーニングすることを含む前記方法。

26. 少なくとも一種の微生物から得られた核酸ライブラリーを選択手順にかけてそこから特定のタンパク質活性を有するタンパク質をコードする核酸配列の全部あるいは一部である一種以上のプローブ核酸配列にハイブリダイズする二本鎖核酸を選択する方法であって

(a)ハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、二本鎖核酸集団を、リガンドに結合した核酸プローブと接触させて、プローブとそれにハイブリダイズする該核酸集団のメンバーの複合体を生成させ、

(b)未結合核酸集団から該複合体を分離し、

(c)該プローブから該プローブに結合した集団のメンバーを遊離させ、

(d)(c)の二本鎖核酸を適當な宿主に導入して、選択された核酸を含む複数のクローンを含むライブラリーを形成し、

(e)該ライブラリーを該特定のタンパク質活性についてスクリーニングする

ことを含む前記方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 酵素活性をスクリーニングする方法

本出願は、1995年12月7日に出願されたアメリカ特許仮出願60/008,317号（係属中）の一部継続出願である1996年8月2日出願のアメリカ特許出願08/692,002号（係属中）の一部継続出願であり、1995年12月7日に出願されたアメリカ特許仮出願60/008,316号（係属中）の一部継続出願である1996年5月22日出願のアメリカ特許出願08/651,568号（係属中）の一部継続出願であり、1995年12月7日に出願されたアメリカ特許仮出願60/008,311号（係属中）の一部継続出願である。

本発明は、発現ライブラリーの作製及び酵素活性についてのそのスクリーニングに関し、特に、微生物のDNAから選択されたDNAを得ること、選択されたDNAから製造された発現ライブラリーを酵素活性についてスクリーニングすること、DNAの指向性突然変異誘発、及び得られた特定のタンパク質、特に酵素、対象となる活性について突然変異を誘発されたDNAを含むクローンをスクリーニングすること、及び熱安定性酵素に関し、特に本発明は、高温で安定であり、低温では改良された活性を有する熱安定性酵素に関する。

### 発明の概要

産業界においては、広範な種類の産業的用途のための新規な酵素の必要性が認識されている。そこで、種々の微生物をスクリーニングしてその微生物が所望の酵素活性を有しているかどうか確認することが行われてきた。そのような微生物が所望の酵素活性を有していれば、それから酵素を回収する。本発明は、酵素をさらなる用途、例えば広範な工業的用途、医療用途、研究試薬として使用するためにキットにパッケージングすること等のために酵素を得る新規な方法を提供するものである。

すなわち、本発明によれば、微生物から組換え酵素が生成され、これらは種々の酵素的特徴により分類されるものである。

特に、本発明の一つの形態によれば、特定の酵素活性を有するクローンを同定するための方法であって、

(i) 上記特定の酵素活性を有する酵素をコードするDNA配列の少なくとも一部を含む少なくとも一種のプローブDNAを使用することにより、少なくとも一

種の

微生物から得たDNAから標的DNAを選択的に単離し、

(ii) 単離された標的DNAを用いて宿主を形質転換して、活性ライプラリースクリーニングまたは核酸ライプラリースクリーニング法を使用して、好ましくは上記特定の酵素活性についてスクリーニングされるクローンのライプラリーを作製すること

により調製されたクローンのライプラリー中で上記の特定の酵素活性についてスクリーニングすることを含む、前記方法が提供される。

この形態の好ましい態様においては、少なくとも一種の微生物から得られるDNAは、プローブDNA配列に例えばハイブリダイゼーションにより特異的に結合するDNAから回収することにより選択される。一種以上の微生物から得たDNAはゲノムDNAであってもよく、あるいはゲノム遺伝子ライプラリーDNAであってもよい。例えば、ベクター結合用に調製されたDNAを使用することもできる。プローブは固相に直接または間接的に結合することができ、これにより、プローブにハイブリダイズしないかDNAあるいは特異的に結合しないDNAからそれを分離する。前記方法は、前記のハイブリダイズしたあるいは結合したDNAを回収した後にそのプローブからDNAを遊離させ、そのように遊離されたDNAを増幅することも含んでもよい。

本発明はまた、遺伝子クラスタータンパク質産物についての発現ライプラリーのスクリーニングを提供し、特に、原核生物または真核生物のDNAから選択された遺伝子クラスターを得ること、及び対象の選択された遺伝子クラスターDNAの発現から得られるタンパク質のファミリーの関連する活性を有するタンパク質の所望の活性について発現ライプラリーをスクリーニングすることを提供する。

特に、この形態の一つの態様は、特定のタンパク質活性を有するクローンを同定するための方法であって、(i) 対象となる特定の活性を有するタンパク質をコードするDNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む少なくとも一種のプローブポリヌクレオチドを使用することにより、少なくとも一

種の生物から得たDNAから標的遺伝子クラスターDNAを選択的に単離し、(i) 単離された標的遺伝子クラスターDNAを用いて宿主を形質転換して、上記の対象の特定の活性についてスクリーニングされるクローンのライブラリーを作製することにより調

製されるクローンのライブラリー上で上記の特定の酵素活性についてスクリーニングすることを含む前記方法が提供される。例えば、 $\lambda$ ベクター中のDNAを使用すると、この経路を使用してDNAをパッケージし、細胞を感染させができるであろう。

この形態の特定の態様においては、生物のゲノムDNAから得られた遺伝子クラスターDNAは、プローブDNA配列に例えればハイブリダイゼーションにより特異的に結合するDNAから回収することにより選択される。ポリヌクレオチドプローブは固相に直接または間接的に結合することができ、それにより、該プローブにハイブリダイズしないDNAあるいは特異的に結合しないDNAがそれから分離される。本発明の方法のこの形態のこの態様は、前記のハイブリダイズしているかあるいは結合したDNAを回収した後にそのプローブから結合DNAを遊離させ、その遊離したDNAを増幅することも含んでもよい。

本発明の別の形態は、異種DNA集団に由来する特定の酵素活性を有する酵素を得るための方法であって、特定の酵素活性の生成に対する指向性突然変異誘発にかけられた異種DNA集団からのDNAを含むクローンのライブラリーを、前記の特定の酵素活性についてスクリーニングすることを含む方法を提供する。

本発明の別の形態は、特定の酵素活性を有する酵素を得るための方法であって、その特定の酵素活性と同じであってもよく異なるものであってもよい以上の所望の特徴を有する酵素をコードするDNAをクローンのライブラリーで生成する試みにおいて指向性突然変異誘発にかけられたDNA集団のプールからのDNAを含むクローンのライブラリーを、その特異的な酵素活性についてスクリーニングすることを含む方法を提供する。好ましい態様においては、指向性突然変異誘発にかけられる前記DNAプールは、少なくとも一種の酵素的特徴、特に少なくとも一種の共通の(common)酵素活性を有する酵素をコードするように選択され

たDNAのプールである。

また、遺伝子クラスターの異種集団に由来する特定の活性を有するタンパク質を得るための方法であって、対象となる特定のタンパク質活性の生成に対する指向性突然変異誘発にかけられた異種遺伝子クラスター集団からの遺伝子クラスターを含むクローンのライブラリーを、前記の特定の酵素活性についてスクリーニングする

ことによる方法を提供する。

また、特定の活性を有する遺伝子クラスタータンパク質産物を得る方法であって、指向性突然変異誘発にかけられた遺伝子クラスター集団のプールからの遺伝子クラスターを含むクローンのライブラリーをその特定のタンパク質活性についてスクリーニングして、前記クローンのライブラリーにおいてその特定のタンパク質活性と同じであってもよく異なるものであってもよい一以上の所望の特徴を有するタンパク質をコードする遺伝子クラスターを生成することを含む方法を提供する。好ましくは、指向性突然変異誘発にかけられる前記遺伝子クラスターのプールは、少なくとも一種の治療的、予防的、あるいは生理学的制御活性の合成における酵素活性を有するタンパク質をコードするように選択されたものである。

これらの形態の方法はいずれも、指向性突然変異誘発の前に、指向性突然変異誘発の前に観察される活性と同じであってもよく異なるものであってもよい少なくとも一種の共通の物理学的、化学的、あるいは機能的特徴を有するタンパク質をコードするポリシストロン性配列を含む遺伝子クラスターを遺伝子クラスターの異種集団から選択的に回収することをさらに含んでいてもよい。好ましくは、遺伝子クラスター調製物の回収は、対象となる遺伝子クラスターの少なくとも一部分についての、固相結合ハイブリダイゼーションプローブのような、特異的な結合相手と遺伝子クラスター集団を接触させることを含む。得られるタンパク質の共通の特徴は、上記に挙げた活性の種類、すなわち共通の合成経路の一部として関与する一連の酵素、あるいはホルモンもしくはシグナル伝達、または代謝経路または病原体におけるそれらの機能等の阻害ができるタンパク質などの種類の

クラスとすることができます。遺伝子クラスターDNAは、対象となる活性を示す異種遺伝子クラスター集団からのそのような遺伝子クラスターDNAを含むクローンから回収される。好ましくは、指向性突然変異誘発は部位特異的指向性突然変異誘発である。この方法はさらに、指向性突然変異誘発にかける前に、上記対象となる活性と同じであってもよく異なるものであってもよい活性について、クローンのライブラリーを予備スクリーニングする工程を含むことができる。この活性は、例えば、対象となるタンパク質、あるいはタンパク質の関連ファミリーの発現から得られるものとすることができます。

これらの形態の方法はいずれも、前記指向性突然変異誘発の前に、特定の酵素活性と同じであってもよく異なるものであってもよい少なくとも一つの共通の特徴を有する酵素をコードするDNA配列を、異種DNA集団から選択的に回収することをさらに含んでいてもよい。好ましくは、DNA調製物の回収は、コード配列の少なくとも部分についての、固相結合ハイブリダイゼーションプローブのような、特異的な結合相手とDNA集団を接触させることを含む。共通の特徴は、例えば酵素活性の一種、例えばヒドロラーゼ活性とすることができる。DNAは、酵素活性の一種を示す異種DNA集団からのDNAを含むクローンから回収される。好ましくは、指向性突然変異誘発は部位特異的指向性突然変異誘発である。この形態の方法はさらに、指向性の突然変異誘発にかける前に、特定の酵素活性と同じであってもよく異なるものであってもよい活性について、クローンのライブラリーを予備スクリーニングする工程を含むことができる。この活性は、例えば、対象となるタンパク質の発現から得られるものとすることができます。

DNAライブラリーが誘導される異種DNA集団はDNAの複合的な混合物であり、例えば環境的なサンプルから得られるものである。そのようなサンプルは、培養できない、あるいは培養されていない、あるいは培養された複数あるいは単一の種の生物を含むものとすることができます。このような環境的サンプルは、例えば、北極及び南極の氷、水あるいは永久凍土ソース、火山起源の材料、熱帯地域の土壤あるいは植物ソース等から得られる。環境的サンプルを対象となる生物について濃縮するためには種々の公知の技術を使用することができ、鑑別培養

(differential culturing)、沈降勾配、アフィニティーマトリックス、毛細管電気泳動、光学ピンセット、蛍光活性化細胞ソーティング等が挙げられる。サンプルは単一の生物の培養物であってもよい。

熱安定性酵素は60°Cを越える温度で機能する酵素である。熱安定性酵素は産業的に、また生物医学的研究で、特定のいくつかの工程が著しく高い温度で行われるアッセイにおいて使用される。熱安定性酵素は、温泉、火山起源のもの、熱帯地域等において見られる好熱性生物から得ることができる。そのような生物の例としては、他の微生物の中でも、例えば、真性細菌及び古細菌のような原核微生物(Bronneomerier, K. and Staudenbauer, W. L., D. R. Woods(ed), the Clos tridia and

Biotechnology, Butterworth Publishers, Stoneham, M. A. (1993))が挙げられる。

熱安定性酵素は、その中温性の対応物と比較してより長い貯蔵寿命と有機溶媒耐性を示す。

所望の最低温度で酵素活性を示す熱安定性酵素には産業上及び研究上の用途がある。この例は、分子診断においてレポーター分子が室温またはより高い温度での長期間の貯蔵において生存しなければならない場合、あるいは通常ではない環境下で機能しなければならない場合、ならびに熱安定性酵素の活性が一般的に非常に低い室温においてそれを使用するアッセイを行う場合等において見られる。

従って、本発明の別の態様は、低温において改良された酵素活性を有し、酵素からなる群から選択されるメンバーである熱安定性酵素、または該酵素をコードするポリヌクレオチドを提供する方法であって、

(a)少なくとも60°Cの温度で安定な少なくとも一種の酵素を突然変異誘発にかけ、

(b)少なくとも60°Cの温度で安定で、50°C未満の温度で酵素活性を有し、工程(a)の酵素よりも高い活性を有する突然変異酵素、または突然変異酵素をコードするポリヌクレオチドについて(a)で製造された突然変異体をスクリーニングすることを含む方法を提供する。

本発明のこれらの形態及びその他の形態は本明細書の教示から当業者に明らかであろう。

#### 図面の簡単な説明

図 1A 及び 1B。図 1A は、実施例 2 に記載した標準及びサンプル a～f を含むアガロースゲルの写真である。サンプル c～f は、実施例 2 に記載したように、2 種の特異的な DNA プローブを使用してゲノム DNA ライブライマーから回収し、遺伝子特異的なプライマーを使用して増幅した DNA を示す。図 1B も、実施例 2 に記載した標準及びサンプル a～f を含むアガロースゲルの写真である。サンプル c～f は、実施例 2 に記載したように、2 種の特異的な DNA プローブを使用してゲノム DNA ライブライマーから回収し、ベクター特異的なプライマーを使用して増幅した DNA を示す。

図 2 は、4 つのコロニーハイブリダイゼーションプレートの写真である。プレート A 及び B は、陽性クローン、すなわち本発明に従って調整した DNA を含み、プローブ配列も含むコロニーを示す。プレート C 及び D は対照であり、陽性クローンを示していない。

図 3 は、サーモコッカス (*Thermococcus*) 9N2 $\beta$ -グリコシダーゼの完全長 DNA 配列及び対応する推定アミノ酸配列を示す。

#### 好ましい態様の詳細な説明

用語「得られた(derived)」または「単離された」は、物質が当初の環境（例えば天然に存在するものである場合は自然の環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生体動物中に存在する天然のポリヌクレオチドあるいはポリペプチドは単離されたものではないが、自然の系において共存するいくらかあるいは全ての物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されたものである。

用語「エラーを起こしやすい PCR (error-prone PCR)」は、DNA ポリメラーゼのコピーの忠実度(fidelity)が低い条件下で PCR を行い、PCR 産物の全長にわたって高い確率で点突然変異が得られるようにした方法をいう (Leung, D. W. ら、Technique, 1:11-15(1989) 及び Caldwell, R. C. & Joyce G. F.

, PCR Methods Appl., 2:28-33(1992))。

用語「オリゴヌクレオチド指向性(directed)突然変異誘発」は、対象となる任意のクローニングされたDNAセグメントにおいて部位特異的突然変異を生成させることができる方法をいう(Reidhaar-Olson, J. F. & Sauer, R. T.ら, Science, 241:53-57(1988))。

用語「アセンブリーPCR(assembly PCR)」は、小さいDNA断片の混合物からのPCR産物のアセンブリーを使用する方法をいう。同じバイアル中で多数の異なるPCR反応が平行して起こり、一つの反応の産物が他の反応の産物の生成を促す(priming)。

用語「性的(sexual)PCR突然変異誘発」は、配列相同性に基づいたDNA分子のランダム断片化により起こされる、異なっているが高度に相関しているDNA配列

のDNA分子間のin vitroでの強制的な相同的組換えと、その後のPCR反応におけるプライマー伸長による乗換え(crossover)の固定をいう(Stemmer, W. P., PNAS, USA, 91:10747-10751(1994))。

用語「in vivo突然変異誘発」は、一種以上のDNA修復経路に突然変異を有する大腸菌の株においてDNAを増幅を使用する、対象となる任意のクローニングDNAにおいてランダム突然変異を生成する方法をいう。これらの「ミューターター」株は野性型親株のものよりも高いランダム突然変異率を有する。これらの株の一つにおけるDNAの増幅により、最終的に該DNA中のランダム突然変異が生成される。

用語「カセット突然変異誘発」は、二本鎖DNA分子の小さい領域を、本来の配列とは異なる合成オリゴヌクレオチド「カセット」により置換するための任意の方法をいう。該オリゴヌクレオチドは、完全に及び／または部分的にランダム化した本来の配列を含むものとすることが多い。

用語「帰納的集合突然変異誘発(recursive ensemble mutagenesis)」は、表現型が関連する変異体の種々の集団であって、そのメンバーがアミノ酸配列において異なるものを製造するために開発されたタンパク質処理(engineering)（タン

パク質突然変異誘発)のためのアルゴリズムをいう。この方法では、フィードバックメカニズムを使用して組合せカセット突然変異誘発の連続的なサイクルを制御する(Arkin, A. P. 及び Youvan, D. C., P N A S , U S A , 89:7811-7815(1992))。

用語「指数的(exponential)集合突然変異誘発」は、ユニークで機能的な変異体を高いパーセンテージで含む組合せライブラーを生成する方法をいい、この方法では、残基の小さい基(groups)が平行してランダム化され、各変化部分で機能的なタンパク質を与えるアミノ酸が同定されるものであり(Delegrave, S. お及び Youvan, D. C., Biotechnology Research, 11:1548-1552(1993))、またランダム及び部位指向性突然変異誘発(Arnold, F. H., Current Opinion in Biotechnology, 4:450-455(1993))をいう。上記で挙げた文献はいずれも引用により全体を本明細書の一部とする。

上記の形態のいずれかについて記載したように、本発明は、微生物から得られた選択されたDNAを含むクローンの酵素活性についてのスクリーニングの方法であって、

微生物のDNAから選択されたDNAを回収することにより製造されたクローンであって、選択されたDNAが特定の活性を有する酵素をコードするDNA配列の部分の全部あるいは一部である少なくとも一種のDNA配列へのハイブリダイゼーションにより選択されたものである、複数のクローンを含むライブラーを特定の酵素活性についてスクリーニングし、

宿主を、選択されたDNAで形質転換して特定の酵素活性についてスクリーニングされるクローンを生成することを含む前記方法を提供する。

- 一つの態様においては、
- (a)二本鎖DNA集団を一本鎖DNA集団にし、
  - (b)ハイブリダイゼーションを可能とする条件下で(a)の一本鎖DNA集団をリガンドに結合したDNAプローブと接触させて、プローブとそれにハイブリダイズするDNA集団のメンバーの二本鎖複合体を生成し、

- (c) (b)の二本鎖複合体を前記リガンドの固相特異的結合相手と接触させて固相複合体を生成し、
- (d) (b)の一本鎖DNA集団から固相複合体を分離し、
- (e) プローブから固相結合プローブに結合した集団のメンバーを遊離させ、
- (f) (e)の集団のメンバーから二本鎖DNAを形成し、
- (g) (f)の二本鎖DNAを適当な宿主に導入して、選択されたDNAを含む複数のクローンを含むライブラリーを形成し、
- (h) 該ライブラリーを特定の酵素活性についてスクリーニングすることにより、微生物から得られたDNAライブラリーを選択手順にかけて、そこから特定の酵素活性を有する酵素をコードするDNA配列の全部あるいは一部である一種以上のプローブDNA配列にハイブリダイズするDNAを選択する。

別の態様においては、

- (a) ハイブリダイゼーションを可能とする条件下で二本鎖DNA集団をリガンドに結合したDNAプローブと接触させて、プローブとそれにハイブリダイズするDNA集団のメンバーの複合体を生成し、
- (b) (a)の複合体を前記リガンドの固相特異的結合相手と接触させて固相複合体を生成

し、

- (c) (b)の未結合DNA集団から固相複合体を分離し、
- (d) プローブから固相結合プローブに結合した集団のメンバーを遊離させ、
- (e) (d)の二本鎖DNAを適当な宿主に導入して、選択されたDNAを含む複数のクローンを含むライブラリーを形成し、
- (f) 該ライブラリーを特定の酵素活性についてスクリーニングすることにより、微生物から得られたDNAライブラリーを選択手順にかけて、そこから特定の酵素活性を有する酵素をコードするDNA配列の全部あるいは一部である一種以上のプローブDNA配列にハイブリダイズする二本鎖DNAを選択する。

別の形態においては、上記方法は、シグナル配列すなわち分泌配列を含むDN

Aを回収するための予備選択を含む。このようにして、シグナル配列すなわち分泌配列を含むDNAのみを上記のようにしてハイブリダイゼーションによりDNA集団から選択することが可能になる。以下のパラグラフに本発明のこの態様のプロトコール、一般的な分泌シグナル配列の種類と機能、及びそのような配列のアッセイや選択方法への具体的な例示的応用をを記載する。

この形態特に好ましい別の態様は、上記(a)の後、(a)の前に、

(i) 所与のクラスのタンパク質にユニークな分泌シグナル配列に相補的なリガンド結合オリゴヌクレオチドプローブに、ハイブリダイゼーションを可能とする条件下で(a)の二本鎖DNA集団を接触させて二本鎖複合体を形成させ、

(ii) (a i)の複合体を該リガンドの固相特異的結合相手と接触させて固相複合体を形成し、

(iii) 該固相複合体を未結合DNA集団から分離し、

(iv) 前記固相結合プローブに結合した集団のメンバーを遊離させ、

(v) 固相結合プローブをそれに結合した集団のメンバーから分離することをさらに含む。

シグナル配列を含むように選択され、単離されたDNAは、次いで上記に記載した選択手順にかけ、そこから特定の酵素活性を有する酵素をコードするDNAから得られた一種以上のプローブDNA配列に結合するDNAを選択し、単離する。

タンパク質が分類されて適切な細胞部位に運ばれる経路は、しばしばタンパク質ターゲッティング(targeting)経路と呼ばれている。これらターゲッティング系の全てにおいて重要な要素の1つは、新しく合成されたポリペプチドのアミノ末端にある、シグナル配列と呼ばれる短いアミノ酸配列である。このシグナル配列は、タンパク質を細胞内の適切な部位へ向かわせる。そして該タンパク質の輸送中または最終目的地へ到着した時にシグナル配列は除去される。ほとんどのリソームタンパク質、膜タンパク質または分泌タンパク質は、小胞体内腔への輸送を定めるアミノ末端シグナル配列を有する。このグループのタンパク質について100個以上のシグナル配列が配列決定されている。これらの配列の長さはさま

まで、13から36アミノ酸残基である。

pMGと称するphoA発現ベクターは、TaphoAと同様、膜にまたがっている(membrane-spanning)配列またはシグナルペプチドをコードする遺伝子を同定するのに有用である。Giladi ら, J. Bacteriol., 175(13) : 4129-4136, 1993。このクローニング系は、外膜および細胞周辺(periplasmic)アルカリホスファターゼ(AP)の融合タンパク質と内膜AP融合タンパク質との区別を容易にするために、pMG組換え体を大腸菌KS330 (StrauchおよびBeckwith, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1576-1580, 1988)によって最初に記述された「ブルーハロー(blue halo)」アッセイに使用された菌株)中に導入して形質転換することによって改変された。pMG/KS330r を用いたクローニングおよびスクリーニング方法は、開裂可能なシグナルペプチドを有するタンパク質をコードする遺伝子を同定することができる。それゆえ、この方法は興味のあるポリペプチドをコードする遺伝子を同定するための第一工程として役立つ。

本発明の別な実施態様は、特定の酵素活性の生成のために人為的(directed)突然変異誘発に暴露した異種DNA集団由来のDNAを有するクローンライブラリーを該特定の酵素活性についてスクリーニングすることによる、異種DNA集団に由来する、特定の酵素活性を有する

酵素を得る方法を提供する。この方法はさらに、上記の人為的突然変異誘発の前に、共通の特徴をコードするDNA配列を含むDNAを上記異種DNA集団から選択的に回収することを含むことができる。この共通の特徴とは、該特定の酵素活性と同一でも異なっていてもよい。この共通の特徴は、たとえば、あるクラスの酵素活性であることができる。このことは、異種DNA集団由来のDNAを有するクローンから、上記クラスの酵素活性を示すDNAを回収することを意味する。

この実施態様においては、好ましくは、DNA調製物の回収はDNA集団をコード配列の少なくとも一部に対する特異的結合パートナー(固相結合ハイブリダイゼーションプローブ等)と接触させることにより行われる。

この実施態様の方法は、人為的突然変異誘発に暴露する前に上記クローンライ

ブラーのある活性（これは該特定の酵素活性と同じでも異なっていてもよい）についてプレスクリーニングすることをさらに含むことができる。上記クローンのプレスクリーニングは、例えば、興味のあるタンパク質の発現についてのスクリーニングでありうる。

本発明の別の実施態様は、特定の酵素活性を有する酵素を得る方法を提供する。この方法は、該特定の酵素活性と同じ、または異なる1つ以上の所望の特徴を有する酵素をコードするDNAをクローンライブラリーにおいて生成させるために、部位特異的でありうる人為的突然変異誘発に暴露したDNA集団のプール由来のDNAを有するクローンライブラリーを該特定の酵素活性についてスクリーニングすることを含んでなる。この実施態様の方法は、人為的突然変異誘発に暴露する前に上記異種DNA集団から少なくとも1つの共通する酵素特性（これは該特定の酵素活性と同じでも異なっていてもよい）をコードするDNA配列を含むDNAを選択的に回収することをさらに含むことができる。

この実施態様においては、DNA調製物の回収は、DNA集団をコード配列の少なくとも一部に対する特異的結合パートナーと接触させ

ることにより実施できる。特異的結合パートナーとは固相結合ハイブリダイゼーションプローブである。異種DNA集団由来のDNAを有し、上記クラスの酵素活性を示すクローンからDNAを回収する。

出願人は、低温において向上した活性を有する熱安定性酵素を提供することが可能であると見いだした。より具体的には、出願人は、好熱性酵素の温度安定性を維持したまま、それら酵素の低温における活性を向上させることができることを見いだしたのである。さらに、熱安定性酵素、またはそのような酵素をコードするポリヌクレオチドを突然変異誘発にかけ、次に生じた変異体をスクリーニングして、熱安定性を保持し、かつ低温において対応する非突然変異酵素に較べて少なくとも2倍の酵素活性を有する突然変異した酵素、または突然変異した酵素をコードするポリヌクレオチドを同定することにより、低温における活性が向上した熱安定性酵素を得ることができることが見いだされた。

熱安定性酵素および突然変異させた熱安定性酵素は、60°Cまでの温度において

安定であり、好ましくは70℃までの温度において安定であり、より好ましくは95℃およびそれ以上の温度まで安定である。

突然変異させた熱安定性酵素の低温における増大した活性とは、対応する野型酵素の活性よりも少なくとも2倍、好ましくは少なくとも4倍、より好ましくは少なくとも10倍大きい活性を包含するものとする。

低温における増大した酵素活性とは、50℃以下、好ましくは40℃以下、より好ましくは30℃以下において酵素活性が増大していることを意味する。したがって、突然変異させた酵素と非突然変異酵素の間で低温における酵素活性を比較すると、規定された低温における突然変異させた酵素の酵素活性は、対応する非突然変異酵素の酵素活性よりも少なくとも2倍大きい。

したがって、低温および低温範囲は、熱安定性酵素が安定である温度よりも少なくとも5℃低い温度を含み、この温度は55℃、50℃、4

5℃、40℃、35℃、30℃、25℃および20℃より低い温度を含む。50℃より低い温度が好ましく、40℃より低い温度がより好ましく、30℃より低い温度（つまり、ほぼ室温）が最も好ましい。

本発明のこの側面にしたがって、そこにおいてより大きい酵素活性が望まれる低温または低温範囲が決定され、そして熱安定性酵素、またはそのような酵素をコードするポリヌクレオチドが突然変異誘発にかけられ、生じた突然変異体をスクリーニングして、熱安定性を保持し、かつ上記所望の温度または温度範囲において酵素活性が所望される最低限の増大を有する突然変異した酵素（または突然変異酵素をコードするポリヌクレオチド）が決定される。

熱安定性酵素とは、60℃より上の温度において活性を有する、すなわち分解しない酵素である。熱安定性酵素はまた、より長い保存寿命を有し、また有機溶媒に対して高い耐性を有する。

熱安定性酵素は、温泉、火山地帯および熱帯などの高温中に見いだされる好熱性生物から単離することができる。好熱性生物の例としては、好熱菌（真正細菌および古細菌等）などの原核生物が挙げられる。

次に、文献に記載されている利用可能な技法を用いて、これらの熱安定性生物

由来のDNAを単離することができる。この目的のために

は、IsoQuick<sup>®</sup>核酸抽出キット (MicroProbe Corporation) が適当である。

または、酵素が発現されて陽性な熱安定性活性についてスクリーニング可能となるように発現ベクターに酵素をコードするDNAを挿入し、以下に記述するような適切な宿主を形質転換することによって、熱安定性を有することが知られていない酵素を熱安定性についてスクリーニングすることができる。

熱安定性酵素をコードする単離されたDNAを、突然変異誘発技法にかける。好ましい種類の突然変異誘発技法は本明細書に記載されている。

上に規定した突然変異誘発技法から分かるように、所望の活性を有

する酵素をコードするDNAを単独で、すなわち裸のDNAとして突然変異誘発にかけてもよいし、または該DNAを本明細書に記述するような適切なベクターに挿入した後に突然変異誘発にかけてもよい。これらの技法をin vitro突然変異誘発と呼ぶ。

または、DNAが細胞または生体内にある時に突然変異誘発にかける場合は、in vivo突然変異誘発を行うことができる。この技法の好ましい例は、多数の異なる突然変異が短時間に起こるように、DNA修復遺伝子 MutH、MutLおよびMutSを欠失した大腸菌XL1 Red株(Stratagene, Inc.)を使用する。30時間以内に10,000個までの突然変異が起こり得るので、当分野で公知の手順によって、突然変異させたDNAから完全な突然変異DNAライブラリーが調製できる。

突然変異が起こるのを可能とする適切な時間が経過した後、in vivo突然変異誘発の場合は宿主細胞から突然変異したDNAを切り取り、別の適切なベクター中に挿入し、これを用いて非ミューターター(mutator)宿主、例えば大腸菌XL1 Blue株を形質転換する。そして次に突然変異DNAライブラリーを調製する。in vitro突然変異誘発の場合には、もし突然変異DNAがすでに適切な発現ベクターに挿入されているならば、突然変異DNAライブラリーの調製のために該ベクターを用いて適切な非ミューターター宿主を直接形質転換する。もし突然変異DNAが適切な発現ベクターに挿入されていないならば、以下のようにする。

適切な生物を形質転換することによって、スクリーニングのためにライブラリーを調製する。突然変異したDNAを有するベクターを、形質転換を促進する条件下で接種することにより人工的に導入して、宿主、特に本明細書に好ましいと具体的に同定されている宿主を形質転換する。

次に、このようにして得られた形質転換クローンのライブラリーを、酵素活性の表現型アッセイを用いてスクリーニングし、興味のある酵素の活性を示すクローンを選択する。

例えば、上記の技法の1つによって突然変異させたDNAから多数のクローンを調製した後、興味のある特定の酵素活性についてこれらのクローンをスクリーニングする。

例えば、突然変異したDNAを有するクローンをスクリーニングにかけ、高温範囲内および所望の低温範囲内における活性を測定し、突然変異させていない対応する野性型熱安定性酵素に較べて該低温範囲内において所望の活性増加を有する突然変異体を同定する。

陽性であると同定されたクローン、すなわち熱安定性であって、かつ低温範囲内の温度において対応する野性型酵素に較べて少なくとも2倍増大した活性を有する熱安定性酵素を発現する突然変異DNA配列を有するクローンを単離し、配列決定し、該DNA配列を同定する。例えば、上記クローンを、つまりは熱安定性酵素を低温に暴露し、そして適切な基質を開裂する能力を試験することによって、所望の低温範囲におけるホスファターゼ活性を同定することができる。

実施例7においては、野性型酵素と突然変異誘発にかけた酵素を比較して、ホスファターゼ活性および $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が測定される。報告される結果から分かるように、野性型ホスファターゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ好熱性酵素の突然変異誘発は、対応する野性型酵素よりも室温の低温範囲内においてそれぞれ3倍および2.5倍活性な突然変異酵素をもたらした。

タンパク質を作製する場合には、好熱性酵素を突然変異誘発にかけた後、突然変異した酵素を所望の活性（すなわち、高温における活性を保持しつつ低温における活性が増大している）についてスクリーニングする。タンパク質突然変異誘

発のための公知技法の任意のものを用いることができるが、特に好ましい突然変異誘発技法は上に論じた技法である。

微生物由来のDNAは、選択手順にかけて特定の酵素活性を有する酵素をコードするDNA由来のDNAとハイブリダイズするDNAを選択し単離するのに先立って、好ましくは適切なベクター（一般に、

発現をもたらすための適切な調節配列を有するベクター）に挿入される。

ライプラリーを調製することができる微生物は、真正細菌および古細菌等の原核微生物、ならびに真菌、ある種の藻類および原生動物等の下等真核微生物を含む。これらの微生物は培養微生物であってもよいし、または環境サンプルから得た非培養微生物であってもよい。そして、これらの微生物は好熱菌、超好熱菌、好冷菌、低温菌等の好局限性細菌であってよい。

上に示すように、環境サンプルからライプラリーを作製することが可能である。この場合、DNAは微生物を培養せずに回収してもよいし、または培養微生物から回収してもよい。

そこから標的DNAを得るための出発材料ライプラリーとしての微生物DNAの供給源は、環境サンプルを含むことが特に意図されている。例えば、北極および南極の氷、水または永久凍結帯の資源、火山性起源の物質、熱帯地方の土壤または植物に由来する物質、等から得られた環境サンプルである。したがって、例えば培養可能または培養不可能な微生物からDNAを回収し、それを用いて適切な組換え発現ライプラリーを作製し、次に酵素活性を測定することができる。

細菌および多くの真核生物は、それらの産物が関連プロセスに関与する複数の遺伝子を調節するための整合された(coordinated)作用機構を有する。これらの遺伝子は1本の染色体上に「遺伝子クラスター」と呼ばれる形で群をなしており、1つの調節配列（全クラスターの転写を開始させる1個のプロモーターを含む）の制御下で一緒に転写される。遺伝子クラスター、プロモーター、および調節に機能する付加的配列は全体として「オペロン」と呼ばれ、通常は2~6個、最大で20個以上の遺伝子を含むことができる。したがって、遺伝子クラスターとは、通常は機能に関して、同一または関連している隣接する遺伝子の1群である。

幾つかの遺伝子ファミリーは複数の同一メンバーからなっている。

クラスターをなす遺伝子は必ずしも同一ではないが、クラスターを形成することは遺伝子間の同一性を維持するための必要条件である。遺伝子クラスターは、隣接する関連遺伝子に対して複製が生成される極端な場合から、数百の同一の遺伝子がタンデムな列をなして存在する場合まで異なっている。時々、特定の遺伝子の反復に何ら重要性が認められない場合がある。この主な例は、他の哺乳動物種においては1個のインスリン遺伝子で十分であるのに、幾つかの種において発現される重複インスリン遺伝子である。

遺伝子クラスター、およびそれによってもたらされるタンパク質を発現するために該クラスターの全長はどの程度まで必要か、をさらに研究することは重要である。さらに、遺伝子クラスターは継続的再編成を受ける。したがって、例えば細菌または他の原核生物源から遺伝子クラスターの異種ライブラリーを作製する能力は、新規なタンパク質、特に、例えば多数の有用な活性を有するポリケチドの合成に関与するポリケチドシンターゼ等の酵素を含めて、タンパク質の供給源を決定するうえで価値がある。遺伝子クラスターの産物であるタンパク質の他の種類もまた、例えば抗生物質、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、インスリン等の調節タンパク質を含めて考慮されている。

ポリケチドは、抗生物質（テトラサイクリンおよびエリスロマイシン）、抗癌剤（ダウノマイシン）、免疫抑制剤（FK506およびラパマイシン）、および動物薬（モネンシン）を含む生物活性の極めて豊かな供給源である分子である。多くのポリケチド（ポリケチドシンターゼによって生成される）は、治療剤として有益である。ポリケチドシンターゼとは、長さ並びに官能性および環化のパターンが異なる極めて多様な炭素鎖の生合成を触媒する多機能酵素である。ポリケチドシンターゼ遺伝子は遺伝子クラスターに該当し、少なくとも1種類（I型と称する）のポリケチドシンターゼは大きいサイズの遺伝子および酵素を有し、それらは遺伝子操作およびこれら遺伝子／タンパク質のin vitro研究を複雑にしている。

研究用の新規なポリケチドの作製のために、ポリケチドおよびポストポリケチド生合成遺伝子のライプラリーから所望の成分を選択して組み合わせる能力は興味深い。本発明の方法は、新規なポリケチドシンターゼのクローニングを容易にする。なぜなら、(特に f 因子に基づくベクターを用いた場合は) 大きい挿入断片を有するクローニングを用いて遺伝子バンクを作製できるからであり、これは遺伝子クラスターのクローニングを容易にする。

好ましくは、遺伝子クラスターDNAはベクターに連結される。特に、検出可能なタンパク質の产生、または連結した遺伝子クラスター由来のタンパク質に関連する多数の活性を制御および調節することのできる発現調節配列をさらに含むベクターに連結することが好ましい。外因性DNA導入のための極端に大きい容量を有するベクターの使用は、そのような遺伝子クラスターと共に使用するのに特に適切であり、例として大腸菌の f 因子（または稔性因子）を含むものを本明細書に記述する。この大腸菌の f 因子とは、接合中にそれ自身の高頻度移行をもたらすプラスミドであって、混合微生物サンプル由来の遺伝子クラスター等の大きいDNA断片を獲得し、それを安定に増殖させるのに理想的である。

次に、文献に記載されている利用可能な技法を用いて、DNAを単

離することができる。この目的のためには、IsoQuick®核酸抽出キット (MicroProbe Corporation) が適当である。

これらの微生物に由来する、またはそれらから単離されたDNAは、選択されたDNAを用いて釣り上げる前に、好ましくはベクターまたはプラスミドに挿入することができる。そのようなベクターまたはプラスミドは、好ましくはプロモーター、エンハンサー、等を含む発現調節配列を有するものである。そのようなポリヌクレオチドはベクターおよび／または構成物の一部ができることが、かつ、そのようなベクターおよび／または構成物は該ポリヌクレオチドの天然の環境ではないという意味で、該ポリヌクレオチドは単離されていることがで

きる。特に好ましいファージまたはプラスミドおよびそれらへの導入およびパッケージング方法は、本明細書に定めるプロトコールに詳細に記述されている。

以下は、培養可能な微生物および培養不可能な微生物の両方から発現ライプラ

リーを作製するための一般的手順の概略を示す。それらのライプラリーを特定のプローブDNAで釣り上げて、ハイブリダイズするDNA配列を選択することができる。

#### 環境サンプル

バイオマスを得る。

DNAの単離（種々の方法）。

DNAを剪断する（25ゲージの針）。

DNAを平滑末端とする（マングビーンヌクレアーゼ）。

DNAをメチル化する（Eco RIメチラーゼ）。

Eco RI リンカーに連結する（GGAAATTCC）。

リンカーを切り戻す（Eco RI制限エンドヌクレアーゼ）。

大きさにより分画する（ショ糖勾配）。

λベクターに連結する（λ ZAP IIおよびgt11）。

パッケージする（in vitro λパッケージング抽出物）。

大腸菌宿主上に播き、増幅させる。

目的の酵素活性を有するクローニングをスクリーニングによって同定する。このスクリーニングは、ハイブリダイゼーションによって目的の酵素をコードするDNAの存在を同定すること、または目的の酵素活性を検出することのいずれかによって実施することができる。

少なくとも1つの微生物由来のDNAから目的の標的DNAを選択的に単離するために用いるプローブDNAは、公知の活性を有する酵素のDNAの全長コード領域配列または部分コード領域配列であってよい。元のDNAライプラリーを、好ましくは、特定の酵素活性を有

する酵素をコードするDNA配列の少なくとも一部を含む混合プローブを用いてプローブすることができる。これらのプローブまたはプローブライプラリーは好ましくは一本鎖であり、プローブされる微生物DNAは好ましくは一本鎖に変換されている。特に適切なプローブは、スクリーニングされるべき特定の酵素活性に類似した、または同一の活性を有する酵素をコードするDNAに由来するもの

である。

プローブDNAは少なくとも約10塩基であり、好ましくは少なくとも15塩基である。1つの実施態様においては、プローブとして全コード領域を用いることができる。少なくとの1つのDNAプローブの使用により標的DNAが選択的に単離されるハイブリダイゼーションの条件は、少なくとも約50%の配列同一性をもたらすハイブリダイゼーションストリンジエンシー、特に少なくとも約70%、好ましくは75%の配列同一性をもたらすストリンジエンシーを提供するように設計される。

微生物DNAライブラリーをプローブして潜む目的のDNAを単離するハイブリダイゼーション技法は当分野で周知であり、そして、文献に記載されている任意の技法、特に該微生物由来の残りのDNAから分離するために固相に直接または間接的に結合したプローブDNAを用いる技法は、本発明に使用するのに適する。プローブを固相に結合させた後、液相ハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。

好ましくは、プローブDNAは特異的結合ペアの一方のパートナー（すなわちリガンド）を用いて「標識」され、ペアの他方のパートナーは固相マトリックスに結合されて、標的をその供給源から分離するのを容易にする。リガンドおよび特異的結合パートナーは以下のものから、どちらの方向にも、選択することができる。すなわち、(1)抗原またはハプテンおよび抗体またはその特異的結合断片；(2)ビオチンまたはイミノビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン；(3)糖およびそれに特異的なレクチン；(4)酵素およびそのインヒビター；(5)アポ酵素および補因子；(6)相補的ホモポリマー性オリゴヌクレオチド；および(7)ホルモンおよびその受容体である。固相は好ましくは(1)ガ

ラスまたはポリマー表面；(2)ポリマービーズを充填したカラム；および(3)磁性または常磁性粒子から選択される。

上記のように調製されたクローンライブラリーは、培養物の増殖、増幅、または他の補助的手順を必要とせずに、酵素活性について直接スクリーニングすることが可能である。しかし、1つの好ましい実施態様においては、各クローンから

回収されたDNAをPCR等によって増幅するが望ましいと考えられる。

さらに、単離された標的DNAの増幅を実施することは任意であるが、望ましい。この実施態様においては、標的DNAは単離後プローブDNAから分離される。次に、宿主の形質転換に用いる前に該単離されたDNAを増幅する。あらかじめ定められたDNA配列を少なくともその一部として含むように選択された二本鎖DNAを一本鎖に変換し、増幅にかけ、再度アニーリングして、増幅された数の選択された二本鎖DNAをもたらすことができる。当分野では現在多数の増幅方法論が周知である。

次に、選択されたDNAを用いて適切な生物を形質転換することによってスクリーニングのためのライブラリーを調製することができる。宿主、特に本明細書中で好ましいと特に同定された宿主は、そのような形質転換を導く条件下で標的DNAを含むベクターを接種することによって人工的に導入して形質転換される。2本鎖環状または直鎖状DNAを用いて形質転換することが可能であり、または1本鎖環状または直鎖状DNAを用いて形質転換する場合もあり得る。

次に、このようにして得られた形質転換されたクローンのライブラリーを酵素活性の表現型アッセイにおいて、目的の酵素活性を示すクローンをスクリーニングする。

ある生物から選択的に単離したDNAに由来する多数のクローンを調製した後、これらのクローンを特定の酵素活性についてスクリーニングし、特定の酵素特性を有するクローンを同定する。

酵素活性に関するスクリーニングは、個々の発現クローンを用いて

実施してもよいし、または最初に発現クローンの混合物を用いて実施して該混合物が1以上の特定の酵素活性を有するかどうかを確認してもよい。もし混合物が特定の酵素活性を有するならば、次にその酵素活性またはより具体的な活性について個々のクローンを再スクリーニングすることができる。したがって、例えばもしクローン混合物がヒドロラーゼ活性を有するならば、次に個々のクローンを回収し、そしてスクリーニングしてどのクローンがドロラーゼ活性を有するか決定することができる。

使用できる発現ベクターの代表的なものとして、ウイルス粒子、バキュロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスマド、フォスマド、細菌性人工染色体、ウイルスDNA（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびS V 4 0誘導体）、P 1に基づく人工染色体、酵母プラスミド、酵母人工染色体、および目的の特定の宿主（枯草菌、アスペルギルス属菌、酵母、等）に特異的な他の任意のベクターを挙げることができる。したがって、例えば、DNAはポリペプチドを発現するための種々の発現ベクターのうちの任意の1つに含まれていればよい。そのようなベクターは染色体、非染色体および合成DNA配列を含む。多数の適切なベクターが当業者には公知であり、市販されている。例として以下のベクターを挙げる。すなわち、細菌性：pQE70, pQE60, pQE-9(Qiagen); psiX174, pBluescript SK, pBluescript KS(Stratagene); pTRC99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT2T(Pharmacia); 真核細胞性：pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG(Stratagene); pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40(Pharmacia)。しかし、宿主中で複製可能で、かつ生存可能であるかぎり、他の任意のプラスミドまたはベクターを用いることができる。

本発明に用いるのに特に好ましい種類のベクターは、f因子複製起点を有する。大腸菌のf因子（または稔性因子）は、接合中にそれ自身の高頻度移行、および細菌染色体自体のより頻度の低い移行をもた

らすプラスミドである。特に好ましい実施態様は、「フォスマド(fosmid)」または細菌性人工染色体（BAC）ベクターと呼ばれるクローニングベクターを用いるものである。これらは、DNAの大きいセグメントを安定に組み込むことができる大腸菌f因子に由来するものである。混合未培養環境サンプル由来のDNAと統合された時、このベクターは大きいゲノム断片を安定した「環境DNAライブラリー」の形で獲得することを可能とする。

微生物由来のDNAを種々の手順によってベクター中に挿入することができる。一般に、該DNA配列は当分野で公知の手順によって適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。このような手順およびその他は当業者の技術の範囲内であると認められる。

発現ベクター中の該DNA配列は、mRNAの合成を指令するため、適切な発現制御配列（プロモーター）に機能しうる形で連結される。特に名前を挙げる細菌性プロモーターは、lacI, lacZ, T3, T7, gpt,  $\lambda P_R$ ,  $P_L$ およびtrpを含む。真核細胞プロモーターは、CMV即時型、HSVチミジンキナーゼ、初期および後記SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスマタロチオネイン-Iプロモーターを含む。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分当業者の技術レベルの範囲内にある。発現ベクターは、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターをも含む。ベクターは発現を増幅させるための適切な配列を含むこともできる。プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランسفエラーゼ）ベクターまたは選択マーカーを有する他のベクターを用いて任意の所望の遺伝子から選択することができる。

さらに、発現ベクターは形質転換宿主細胞の選択のために、好ましくは表現型的特徴を提供する1以上の選択マーカー遺伝子（例えば、真核細胞培養物のためにはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性、あるいは大腸菌においてはテトラサイクリンあるいはアンピシリン耐性、等）を含む。

一般に、組換え発現ベクターは複製起点、宿主細胞の形質転換を可能とする選択マーカー（例えば、大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子およびS.セレビシエ(S. cerevisiae)のTRPI遺伝子）、および下流構造配列の転写を指令するための、高発現遺伝子由来のプロモーターを含む。このようなプロモーターは、とりわけ3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)等の解糖酵素、 $\alpha$ 因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質をコードするオペロン由来のものであり得る。異種構造配列は、適切な段階で、翻訳開始および終結配列、ならびに好ましくは翻訳されたタンパク質の細胞周辺腔または細胞外の培地への分泌を指令することのできるリーダー配列と共に組み立てられる。

上記のように選択し、単離したDNAを適切な宿主に導入し、ライプラリーを調製する。このライプラリーは、所望の酵素活性についてスクリーニングされる。好ましくは、選択されたDNAは適切な制御配列を含むベクター中にすでに挿入されていて、酵素をコードする選択されたDNAをそれによって発現させ、所

望の活性を検出する。宿主細胞は、哺乳動物細胞等の高等真核細胞、または酵母細胞等の下等真核細胞でありうる。または、宿主細胞は細菌細胞等の原核細胞でありうる。宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーションによって実施することができる(Davis, L., Dibner, M., Battey, J., Basic Methods in Molecular Biology, (1986))。

適切な宿主の代表的な例としては、大腸菌、ストレプトミセス(*Streptomyces*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)等の細菌細胞；酵母等の真菌細胞；ショウジョウバエ(*Drosophila*)S2 およびスパドプテラ(*Spodoptera*)Sf9等の昆虫細胞；CHO、COSまたはBowes黒色腫等の動物細胞；アデノウイルス；植物細胞、等が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は、本明細書の教示より当業者の技術的範囲内にあると見なされる。

組換えタンパク質を発現するのに用いることができる種々の哺乳動物細胞培養系を特に挙げるならば、哺乳動物発現系の例はGluzman, Cell, 23:175(1981)によつて記述されているサル腎臓繊維芽細胞COS-7細胞系、および和合性の(compatible)ベクターを発現することができる他の細胞系、例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK 細胞系等を含む。哺乳動物発現ベクターは複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、および任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与および受容部位、転写終止配列、および5' 隣接非転写配列を含む。SV40のスプライスおよびポリアデニル化部位由来のDNA配列を用いて必要とされる非転写遺伝子エレメントを提供することができる。

宿主細胞は一般にベクターを用いて遺伝子工学的に操作（形質導入または形質転換またはトランスフェクション）される。操作された宿主細胞は、プロモーターを活性化させ、形質転換体を選択し、または遺伝子を増幅するのに適切なように改変された常用の栄養培地で培養することができる。培養条件（温度、pH、等）は発現のために選択された宿主細胞に対して以前に用いられたものあり、当業者には明らかである。

当分野で公知の手順により、ライブラリーを特定の酵素活性についてスクリー

ニングすることができる。例えば、6つのIUBクラス、すなわちオキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼおよびリガーゼの1以上について酵素活性をスクリーニングすることができる。次に、1以上のIUBクラスについて陽性であると確認された組換え酵素を、より特異的な酵素活性について再スクリーニングすることができる。

または、より特殊化した酵素活性についてライブラリーをスクリーニングすることができる。例えば、ヒドロラーゼ活性について一般的にスクリーニングする代わりに、より特殊化した活性、すなわちヒドロラーゼが作用する結合の種類についてライブラリーをスクリーニン

グすることができる。したがって、例えばライブラリーをスクリーニングして、1以上の特定の化学的官能性、例えば(a)アミド(ペプチド結合)、すなわちプロテアーゼ；(b)エステル結合、すなわちエステラーゼおよびリパーゼ；(c)アセタール、すなわちグリコシダーゼ、等に作用するヒドロラーゼを突き止めることができる。

次に、特定の酵素活性を有すると同定されたクローンを配列決定して、該特定の活性を有する酵素をコードするDNA配列を同定することができる。したがって、本発明によれば、(i)特定の酵素活性を有する酵素をコードするDNA、(ii)そのような活性を有する酵素(そのアミノ酸配列を含む)を単離し同定して、そして(iii)そのような活性を有する組換え酵素を作製することができる。

または、その活性についてスクリーニングを行なった酵素活性を有することが判明したクローンを配列決定し、次に人為的突然変異誘発にかけて所望の活性を有する新しい酵素を開発するか、または野性型酵素には存在しない、あるいはそれほど顕著でない特に望ましい特性(例えば、熱または有機溶媒に対する安定性)を有する改変酵素を開発することができる。人為的突然変異誘発のための公知技法のうち任意のものを本発明に適用することができる。例えば、本発明にしたがって使用するのに特に好ましい突然変異誘発技法は、以下に記載の技法を含む。

本発明は、例えば下記の用途に用いることができる下記の活性を有する新規な

酵素を同定または作製するのに用いることができる。

1. リパーゼ／エステラーゼ

- a. エステル（脂質）／チオエステルのエナンチオ選択的加水分解
  - 1) ラセミ混合物の分割
  - 2) メゾジエステルからの光学活性な酸またはアルコールの合成

b. 選択的合成

- 1) 炭水化物エステルの位置特異的加水分解
- 2) 環状第二級アルコールの選択的加水分解
- c. 光学活性なエステル、ラクトン、酸、アルコールの合成
  - 1) 活性化／非活性化エステルのエステル交換反応
  - 2) インターエステリフィケーション
  - 3) ヒドロキシエステル由来の光学活性ラクトン
  - 4) 無水物の位置選択的およびエナンチオ選択的開環

d. 界面活性剤

- e. 脂肪／油変換
- f. チーズの熟成

2. プロテアーゼ

- a. エステル／アミド合成
  - b. ペプチド合成
  - c. アミノ酸エステルのラセミ混合物の分割
  - d. 非天然アミノ酸の合成
  - e. 界面活性剤／タンパク質加水分解
3. グリコシダーゼ／グリコシルトランスフェラーゼ
- a. 糖／ポリマー合成
  - b. グリコシド結合を開裂して单糖、二糖およびオリゴ糖を形成
  - c. 複合オリゴ糖の合成
  - d. UDP-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いたグリコシド合成
  - e. 二糖、フッ化グリコシル、アリールガラクトシドのグリコシル転移

- f. オリゴ糖合成におけるグリコシル転移
- g.  $\beta$ -グルコシルスルホキシドのジアステレオ選択的開裂
- h. 非対称グリコシル化
- i. 食品加工
- j. 紙加工

4. ホスファターゼ／キナーゼ

- a. リン酸エステルの合成／加水分解
  - 1) 位置選択的、エナンチオ選択的リン酸化
  - 2) リン酸エステルの導入
  - 3) リン脂質前駆体の合成
  - 4) 制御されたポリヌクレオチド合成
- b. 生物学的分子の活性化
- c. 保護基の不在下における選択的リン酸結合形成

5. モノ／ジオキシゲナーゼ

- a. 活性化されていない有機基質の直接的オキシファンクショナリゼーション  
(oxyfunctionalization)
- b. アルカン、芳香族化合物、ステロイドのヒドロキシル化
- c. アルケンのエポキシ化
- d. エナンチオ選択的スルフォキシド化
- e. 位置選択的および立体選択的バイヤー-ビリガー(Bayer-Villiger)酸化

6. ハロペロキシダーゼ

- a. 求核部位へのハログン化物イオンの酸化的付加
- b. 次亜ハロゲン酸のオレフィン結合への添加
- c. シクロプロパンの環開裂
- d. オルトまたはパラ誘導体に変換された活性化芳香族基質
- e. 2-ハロー誘導体に変換された1,3ジケトン
- f. 硫黄および窒素含有基質のヘテロ原子酸化
- g. 酢酸エノール、アルキン、および活性化芳香族環の酸化

7. リグニンペルオキシダーゼ／ジアリールプロパンペルオキシダーゼ

- a. C—C結合の酸化的開裂
- b. ベンジルアルコールのアルデヒドへの酸化
- c. ベンジルカーボンのヒドロキシル化

d. フェノール二量体化

- e. 二重結合をヒドロキシル化して、ジオールを形成
- f. リグニンアルデヒドの開裂

8. エポキシドヒドロラーゼ

- a. 鏡像異性体的に純粋な生物活性化合物の合成
- b. エポキシドの位置選択的およびエナンチオ選択的加水分解
- c. モノオキシゲナーゼにより芳香族およびオレフィンをエポキシ化し、エポキシドを形成

d. ラセミエポキシドの分割

- e. ステロイドエポキシドの加水分解

9. ニトリルヒドラターゼ／ニトリラーゼ

- a. 脂肪族ニトリルのカルボキシアミドへの加水分解
- b. 芳香族、複素環式、不飽和脂肪族ニトリルの対応する酸への加水分解
- c. アクリロニトリルの加水分解
- d. 芳香族およびカルボキシアミド、カルボン酸（ニコチンアミド、ピコリンアミド、イソニコチンアミド）の生産
- e. アクリルジニトリルの位置選択的加水分解
- f. a-ヒドロキシニトリル由来の $\alpha$ -アミノ酸

10. トランスアミナーゼ

- a. オキソ酸へのアミノ基の転移

11. アミダーゼ／アシラーゼ

- a. アミド、アミジン、および他のC—N結合の加水分解
- b. 非天然アミノ酸の分割および合成

以下の実施例は本発明を説明するものであって、その範囲を限定するものでは

ない。

### 実施例 1 哺乳動物DNAライブラリーの調製

以下に、潜水調査中にSanta Catalina Basinの深さ1240メートルで見つけたクジラの骨の外部表面サンプルから遺伝子ライブラリーを作製するのに用いた方法の概要を説明する。

#### DNAの単離

製造業者の指示に従うIsoQuick法。

#### DNAの剪断

1. 25G二重ハブ針および1ccシリンジにより約500回、DNAを激しく押引する。

2. 該DNAの大半が所望のサイズの範囲内（約3～6 kb）であることを確認するために、0.8%アガロースゲル上で少量（0.5 μg）を調べる。

#### DNAの平滑化

1. 以下のものを加える：

H <sub>2</sub> O	最終容量が405 μlになるまで
45 μl	10×Mung Bean緩衝液
2.0 μl	Mung Beanヌクレアーゼ（150u/μl）。

2. 37°Cで15分間インキュベートする。

3. フェノール／クロロホルムで1回抽出する。

4. クロロホルムで1回抽出する。

5. 氷冷エタノール1mlを加えて沈殿させる。

6. 氷上に10分間放置する。

7. ミクロフュージ中、高速で30分間遠心する。

8. 70%エタノール1mlで洗浄する。

9. ミクロフュージ中、高速で10分間遠心し、乾燥する。

#### DNAのメチル化

1. DNAを26 μl TEに穏やかに再懸濁する。

2. 以下のものを加える：

4.0  $\mu$ l 10×EcoRIメチラーゼ緩衝液  
0.5  $\mu$ l SAM (32mM)  
5.0  $\mu$ l EcoRIメチラーゼ (40u/ $\mu$ l)。

3. 37°Cで1時間インキュベートする。

平滑末端の確保

1. 該メチル化反応へ以下のものを加える：

5.0  $\mu$ l 100mM MgCl<sub>2</sub>  
8.0  $\mu$ l dNTP混合物 (dGTP、dATP、dTTP、dCTPのそれぞれの2.5mM  
)  
4.0  $\mu$ l クレノウ (5u/ $\mu$ l)

2. 12°Cで30分間インキュベートする。

3. 450  $\mu$ l 1×STEを加える。

4. フェノール／クロロホルムで1回抽出する。

5. クロロホルムで1回抽出する。

6. 氷冷エタノール1mlを加えて沈殿させ、氷上に10分間放置する。

7. ミクロフュージ中、高速で30分間遠心する。

8. 70%エタノール1mlで洗浄する。

9. ミクロフュージ中、高速で10分間遠心し、乾燥する。

リンカーの連結

1. DNAをTris-EDTA (TE) 7  $\mu$ lに穏やかに再懸濁する。

2. 以下のものを加える：

14  $\mu$ l リン酸化EcoRIリンカー (200ng/ $\mu$ l)  
3.0  $\mu$ l 10×連結緩衝液  
3.0  $\mu$ l 10mM rATP  
3.0  $\mu$ l T4 DNAリガーゼ (4Wu/ $\mu$ l)。

3. 4°Cで一晩インキュベートする。

EcoRI切断

1. 連結反応を68°Cで10分間加熱して失活させる。
2. 以下のものを加える :
 

237.9 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
30 $\mu$ l	10×EcoRI緩衝液
2.1 $\mu$ l	EcoRI制限酵素 (100u/ $\mu$ l)。
3. 37°Cで1.5時間インキュベートする。

4. 0.5M EDTA 1.5  $\mu$ lを加える。
5. 氷上に放置する。
- ショ糖勾配 (2.2ml) サイズ分画
  1. サンプルを65°Cに10分間加熱する。
  2. ショ糖勾配2.2ml上に穏やかにローディングする。
  3. ミニの超遠心機中、45K、20°Cで4時間遠心する（中断なし）。
  4. 勾配管の底に20G針で穴をあけ、その針を通してショ糖を流すことにより、画分を集め。Falcon2059管内に最初の20滴を集め、ついで10個の1滴画分（1～10と標識）を集める。各滴は、約60  $\mu$ lの容量である。
  5. 各画分5  $\mu$ lを0.8%アガロースゲル上を流し、そのサイズを確認する。
  6. 画分1～4（約10～1.5kb）をプールし、別の管内に画分5～7（約5～0.5kb）をプールする。
  7. 氷冷エタノール1mlを加えて沈殿させ、氷上に10分間放置する。
  8. ミクロフュージ中、高速で30分間遠心する。
  9. 70%エタノール1mlで洗浄する。
  10. ミクロフュージ中、高速で10分間遠心し、乾燥する。
  11. それぞれをTE緩衝液10  $\mu$ lに再懸濁する。
- ラムダアームに対する試験的な連結
  1. およその濃度を得るためにプレートアッセイを行なう。臭化エチジウムを含有するアガロース上に、標準物（既知濃度のDNAサンプル）と共にサンプル0.5  $\mu$ lをスポットする。紫外線中で観察し、該標準物と比較して濃度を推定する。画分1～4=>1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l。画分5～7=500ng/ $\mu$ l

2. 以下の連結反応 (5  $\mu$ l反応) を調製し、4°Cで一晩インキュベートする。

サンプル	H <sub>2</sub> O	10×リガーゼ 緩衝液	10mM rATP	ラムダーム (gt11 および ZAP)	挿入DNA	T4 DNAリガーゼ (4Wu/ $\mu$ )
画分1~4	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l

画分5~7	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
-------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

試験パッケージおよびプレート

1. 製造業者のプロトコールに従い、該連結反応物をパッケージングする。パッケージング抽出物当たり2.5  $\mu$ lをパッケージングする（1連結当たり2抽出物）。

2. SM 緩衝液500  $\mu$ lでパッケージング反応を停止し、同じ連結に由来するパッケージングをプールする。

3. それぞれの1.0  $\mu$ lを適当な宿主上で力価測定する ( $OD_{600}=1.0$ ) [ZAPではXLI-Blue MRF、gt11ではY1088]。

200  $\mu$ lの宿主 (mM MgSO<sub>4</sub>中) をFalcon2059管へ加える。

パッケージングされたファージ1  $\mu$ lを接種する。

37°Cで15分間インキュベートする。

約3mlの48°Cの重層寒天を加える。

[150  $\mu$ lのIPTG (0.5M) および300  $\mu$ lのX-GAL (350mg/ml) を含有する50mlのストック]

100mmプレート上にプレーティングし、37°Cで一晩インキュベートする。

4. 効率の結果

gt11 : 1.7 × 10<sup>4</sup>個の組換え体 (95%バックグラウンド)

ZAP II : 4.2 × 10<sup>4</sup>個の組換え体 (66%バックグラウンド)

ショ糖勾配および有機抽出によりDNAサンプル中の混入物は除去されたかも

しれないが、該混入物が酵素反応を阻害した可能性がある。DNAサンプルは貴重であったため、クローニングのために末端を「固定（fix）」することを試みた。

#### DNAの再平滑化

1. ラムダームに連結しなかった残りのすべてのDNA（画分1～7）をプールし、最終容量が12μlになるまでH<sub>2</sub>Oを加える。ついで以下のものを加える：

143 μl	H <sub>2</sub> O
20 μl	10×緩衝液2 (StratageneのcDNA Synthesis Kitから)
23 μl	平滑化用dNTP (StratageneのcDNA Synthesis Kitから)
2.0 μl	Pfu (StratageneのcDNA Synthesis Kitから)

2. 72℃で30分間インキュベートする。
3. フェノール／クロロホルムで1回抽出する。
4. クロロホルムで1回抽出する。
5. 3M NaOAc 20μLおよび氷冷エタノール400μlを加えて沈殿させる。
6. -20℃で一晩放置する。
7. ミクロフュージ中、高速で30分間遠心する。
8. 1mlの70%エタノールで洗浄する。
9. ミクロフュージ中、高速で10分間遠心し、乾燥する。

(DNAは処理の第1ラウンドで既にメチル化されているため、DNAのメチル化は行なわない)

#### アダプター連結

1. DNAを8μlのEcoRIアダプター (StratageneのcDNA Synthesis Kitから)に穏やかに再懸濁する。

2. 以下のものを加える：

1.0 μl	10×連結緩衝液
1.0 μl	10mM rATP
1.0 μl	T4 DNAリガーゼ (4Wu/μl)

3. 4℃で2日間インキュベートする。

(今回はアダプターを使用しているため、切断はしない。その代わりに、リン酸化が必要である)

アダプターのリン酸化

1. 連結反応を70°Cで30分間加熱して失活させる。

以下のものを加える：

1.0 $\mu$ l	10×連結緩衝液
2.0 $\mu$ l	10mM rATP
6.0 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
1.0 $\mu$ l	PNK (Stratageneのc DNA Synthesis Kitから)
3.	37°Cで30分間インキュベートする。
4.	31 $\mu$ lのH <sub>2</sub> Oおよび5 $\mu$ lの10×STEを加える。

5. Sephadryl S-500スピンカラム上でサイズ分画する（プール画分1～3）

- 6. フェノール／クロロホルムで1回抽出する。
- 7. クロロホルムで1回抽出する。
- 8. 氷冷エタノールを加えて沈殿させる。
- 9. 氷上で10分間放置する。
- 10. ミクロフュージ中、高速で30分間遠心する。
- 11. 1mlの70%エタノールで洗浄する。
- 12. ミクロフュージ中、高速で10分間遠心し、乾燥する。
- 13. 10.5  $\mu$ lのTE緩衝液に再懸濁する。

プレートアッセイは行わない。その代わりに、2.5  $\mu$ lのDNAを使用し水を使用しないこと以外は前記のとおりに、アームに直接連結する。

前記のとおりに、パッケージングおよび力価測定を行なう。

効率の結果：

gt11 : 2.5 × 10<sup>6</sup>個の組換え体 (2.5%バックグラウンド)

ZAP II: 9.6 × 10<sup>5</sup>個の組換え体 (0%バックグラウンド)

ライプラリーの増幅 (各ライプラリーからの5.0 × 10<sup>5</sup>個の組換え体)

1. 3.0mlの宿主細胞 ( $OD_{660}=1.0$ ) を2本の50ml円錐管へ加える。
  2. 円錐管1本当たり $2.5 \times 10^5$ pfuを接種する。
  3. 37°Cで20分間インキュベートする。
  4. 最終容量が45mlになるまで、各管へ重層寒天を加える。
  5. 該管を5枚の150mmプレートの全体にプレーティングする。
  6. プラークのサイズがピンの頭くらいの大きさになるまで、37°Cで6~8時間インキュベートする。
  7. 8~10mlのSM緩衝液で重層し、4°Cで一晩放置する（可能ならば、穏やかに振とうしながら）。
- ファージの収穫
1. 各プレートから50ml円錐管中へSM緩衝液を注ぐことによりファージ懸濁液を回収する。
  2. 3mlのクロロホルムを加え、激しく振とうし、室温で15分間インキュベートする。

3. 2K rpmで10分間遠心して、細胞デブリを除く。
  4. 上清を無菌フラスコ中へ注ぎ、500μlのクロロホルムを加える。
  5. 4°Cで保存する。
- 増幅ライブライアリの力価測定
1. 系列希釀を作製する。  
 $10^{-5} = 1\text{ ml}$ のSM緩衝液中の $1\text{ }\mu\text{l}$ の増幅ファージ  
 $10^{-6} = 1\text{ ml}$ のSM緩衝液中の $1\text{ }\mu\text{l}$ の $10^{-3}$ 希釀
  2. 200μlの宿主（10mM MgSO<sub>4</sub>中）を2本の管へ加える。
  3. 一方に $10\text{ }\mu\text{l}$ の $10^{-6}$ 希釀物（ $10^{-5}$ ）を接種する。
  4. もう一方に $1\text{ }\mu\text{l}$ の $10^{-6}$ 希釀物（ $10^{-6}$ ）を接種する。
  5. 37°Cで15分間インキュベートする。
  6. 約3ml、48°Cの重層寒天を加える。
- [ $150\text{ }\mu\text{l}$ のIPTG (0.5M) および $375\text{ }\mu\text{l}$ のX-GAL (350mg/ml) を含有する50mlのストック]

7. 100mmプレート上でプレーティングし、37°Cで一晩インキュベートする。

8. 結果：

gtl 1 :  $1.7 \times 10^{11}/\text{ml}$

ZAP II :  $2.0 \times 10^{10}/\text{ml}$

実施例2

ピコプランクトンゲノムDNAの安定で大きな挿入DNAライブラリーの構築

細胞の採取およびDNAの調製

濃縮されたピコプランクトン細胞を含有するアガロースプラグを、オレゴン州ニューポートからハワイ州ホノルルまでの海洋巡航で採取されたサンプルから調製した。海水（30リットル）をNiskinボトル内に採取し、 $10\mu\text{m}$ のNitrexに通してスクリーニングし、分子量30,000 カットオフポリスルホンフィルターに通す中空糸濾過（Amicon DC10）により濃縮した。濃縮された細菌プランクトン細胞を $0.22\mu\text{m}$ 、47mm Duraporeフィルター上で集め、1mlの2×STE緩衝液（1M NaCl、0.1M EDTA、10mM Tris(pH8.0)）に再懸濁し、最終密度を約 $1 \times 10^{10}$ 細胞/mlとした。該細胞懸濁液を、40°Cまで冷却した1容量の1%溶融Seaplaque LMPアガロース(FMC)と混合し、ついで直ちに1mlシリジンジ中に取った。該シリジンジをバラ

フィルムで密封し、氷上で10分間放置した。該細胞含有アガロースプラグを10mlの溶解緩衝液（10mM Tris(pH8.0)、50mM NaCl、0.1M EDTA、1%Sarkosyl、0.2%デオキシコール酸ナトリウム、1mg/mlリゾチーム）中に押出し、37°Cで1時間インキュベートした。ついで該アガロースプラグを40mlのESP緩衝液（1%Sarkosyl、1mg/mlプロテイナーゼK（0.5M EDTA中））に移し、55°Cで16時間インキュベートした。該溶液をデカントし、新鮮なESP緩衝液で置換し、55°Cでさらに1時間インキュベートした。ついで該アガロースプラグを50mM EDTA中に入れ、海洋巡航の間、船に4°Cで保存した。

オレゴン海岸沖合いで採取したサンプルから調製したアガロースプラグ（72μl）の1個の切片を、2mlの微量遠心管中、1mlの緩衝液A（100mM NaCl、10mM Bis Tris Propane-HCl、100μg/mlアセチル化BSA:25°CでpH7.0）に対して4°C

で一晩透析した。該溶液を、 $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ および $1\text{mM}$  DTT を含有する $250\mu\text{l}$ の新鮮な緩衝液Aで置換し、振盪するプラットホーム上、室温で1時間インキュベートした。ついで該溶液を、4UのSau3A1 (NEB) を含有する $250\mu\text{l}$ の同じ緩衝液に変え、水浴中で $37^\circ\text{C}$ に平衡化し、ついで振盪するプラットホーム上、 $37^\circ\text{C}$ のインキュベーター中に45分間インキュベートした。該プラグを $1.5\text{ml}$ 微量遠心管へ移し、 $68^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートして、該酵素を失活させ、アガロースを溶融した。該アガロースの消化および該DNAの脱リン酸化を、それぞれ、GelaseおよびHK-ホスファターゼ (Epicentre) を製造業者の推奨に従い使用して行なった。穏やかにフェノール／クロロホルムで抽出することによりタンパク質を除去し、該DNAをエタノール沈殿させ、ペレット化し、ついで70%エタノールで洗浄した。pFOS1ベクターに連結するために、この部分消化されたDNAを $2.5\text{ng}/\mu\text{l}$ の濃度になるまで無菌水に再懸濁した。

アガロースプラグのいくつかから得たPCR增幅の結果（データは示していない）は、有意量の古細菌 (archaeal) DNAの存在を示した。1つのサンプルから抽出しオレゴン海岸沖合いの深さ $200\text{m}$ で集めたrRNAを用いる定量的ハイブリダイゼーション実験は、この集合体内の浮遊古細菌が、全ピコプランクトン生物量の約4.7%を含むことを示した（このサンプルは、DeLongら、南極海洋のピコプランクトン中の古細菌の高い存在量 (high abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton), Nature, 371:695-698, 1994の表1中の「PAC1」 -  $200\text{m}$ に対応する）。アガロースプラグライゼート上で行なった古細菌偏向性 (archaeal-biased) rDNA PCR增幅の結果から、このサンプル中に比較的多量の古細菌DNAの存在が確認された。このピコプランクトンサンプルから調製したアガロースプラ

グを、後続のフォスマミドライブラーの調製のために選択した。この部位からのそれぞれ $1\text{ml}$ のアガロースプラグは、 $7.5 \times 10^5$ 個の細胞を含有していた。したがって、約 $5.4 \times 10^5$ 個の細胞が、部分消化DNAの調製で用いた $72\mu\text{l}$ の切片中に存在していた。

ベクターームは、文献記載 (Kim ら, F因子に基づくベクター中のカスミド

サイズのヒトDNA挿入断片の安定な増殖(Stable propagation of casmid size d human DNA inserts in an F factor based vector), Nucl. Acids Res., 20:1 0832-10835, 1992) のとおりpFOS1から調製した。簡単に言えば、該プラスミドをAstIIで完全に消化し、HK ホスファターゼで脱リン酸化し、ついでBamHIで消化して、2つのアーム（それらはそれぞれ、35～45kbpの連結DNAのクローニングおよびパッケージングのための適切な配向でcos部位を含有していた）を得た。部分消化されたピコプランクトンDNAを、ベクターおよび挿入断片（それぞれ25ng）および1UのT4 DNAリガーゼ (Boehringer-Mannheim) を含有する15μl連結反応中、PFOS1アームに一晩連結した。4μlのこの反応液中の連結DNAを、Gigapack XLパッケージング系 (Stratagene) を用いてin vitroパッケージングし、該フォスミド粒子を大腸菌 (E. coli) DH10B株 (BRL) にトランスフェクトし、該細胞をLB<sub>cm15</sub>プレート上に広げた。得られたフォスミドクローンを、7%グリセロールが補充されたLB<sub>cm15</sub>を含有する96ウェルマイクロタイヤー皿内に拾い入れた。ピコプランクトンDNA挿入断片の約40kbをそれぞれが含有する組換えフォスミドは、クローン化DNAの約1.4×10<sup>8</sup>塩基対を含有する3,552個のフォスミドクローンのライプラリーを与えた。調べたクローンはすべて、38～42kbpの範囲の挿入断片を含有していた。このライプラリーは、後の分析のために、-80℃で凍結保存した。

### 実施例3

#### ハイブリダイゼーション選択および発現ライプラリーの作製

実施例1に記載のとおりに調製したプラスミドライプラリーから出発して、本実施例に記載のプロトコールに従いハイブリダイゼーション選択および発現ライプラリーの調製を行なった。該ライプラリーは、単離された微生物、富化培養物または環境サンプルからのDNAを含有し得る。

一本鎖DNAは、以下の2つの方法のうちの1つにより作製する。1) 該プラスミドライプラリーを増殖させ、二本鎖プラスミドDNAを単離することができる。F1遺伝子 II タンパク質およびエキソヌクレアーゼIIIを用いて、該二本鎖DNAを一本鎖にする。遺伝子 I

I タンパク質はF1起点で二本鎖プラスミドに切れ目を入れ、ExoIIIは、その切れ目が入った鎖を消化除去して、一本鎖環を与える。この方法は、Life TechnologiesのGeneTrapper<sup>TM</sup>キットで用いられている。2) 第2の方法は、二本鎖プラスミドの鎖の1つを「レスキュー」するためにヘルバーファージを使用することを含む。該プラスミドライブラーーを、一晩小培養により増殖させる。これの小さなアリコートをVCS-M13ヘルバーファージと混合し、再び一晩増殖させる。翌朝、該ファージミド（一本鎖DNAを含有するウイルス粒子）を培地から回収し、以下のプロトコールで使用する。

#### プロトコール

1. ライブラーー#17からのレスキューされた一本鎖DNA 4  $\mu$ g の6個のサンプルを、3×SSC緩衝液中で調製した。最終反応容量は30  $\mu$ lであった。

2. これらの溶液へ、以下のうちの1つを加えた。

a)何も加えない

b)無関係な配列からのビオチン化プローブ100ng

c, d)生物#13 DNAポリメラーゼ遺伝子からのビオチン化プローブ100ng

e, f)生物#17 DNAポリメラーゼ遺伝子からのビオチン化プローブ100ng

これらの生物のDNAポリメラーゼ遺伝子の一部をコードする約1300bp長の断片のPCR增幅により、ビオチン化プローブを調製した。該增幅産物は、增幅混合物中でビオチン化dUTPを使用して得た。合成中に、この修飾ヌクレオチドをDNAの全体に取込ませる。QIAGEN PCR Clean-upキットを使用して、未取込みのヌクレオチドを除去した。

3. 95°Cまで2分間加熱することにより、これらの混合物を変性させた。

4. サンプルa, b, dおよびfについては70°Cで90分間のハイブリダイゼーションを行なった。サンプルcおよびeは60°Cでハイブリダイズさせた。

5. 洗浄しブロッキングしたMPGビーズの50  $\mu$ lを加え、各サンプルと混合した。これらの混合物を5分毎に合計30分間攪拌した。保存剤を含有する緩衝液中でMPGビーズを1 mg/mlで送って、100  $\mu$ lの6セットを3×SSC 中で2回洗浄し、超音波処理されたサケ精子DNAの100  $\mu$ gを含有する3×SSCの60  $\mu$ lに再懸濁した。

6. 該DNA／ビーズ混合物を0.1×SSC／0.1%SDS 中室温で2回、0.1×SSC／0.1%SDS 中42℃で2回、それぞれ10分間洗浄し、さらに3×SSC で室温で洗浄した。

7. 該ビーズを50 μl TE中で70℃まで15分間加熱することにより、該結合DNAを溶

出した。

8. 溶出したDNAを希釈し、遺伝子特異的プライマーまたはベクター特異的プライマーのいずれかを使用してPCR増幅を行なった。該ライブライアリ-DNAの希釈物を標準として使用した。

9. 該DNA内に含有されているDNA挿入断片を、ベクター特異的プライマーを使用するPCRにより増幅した。TAクローニング系 (Invitrogen) を使用して、これらの挿入断片をクローニングした。

10. サンプルdおよびfからの92個の白色コロニーおよび4個の青色コロニーの重複体を一晩増殖させ、サザンプロット用にコロニーリフト (colonylift) を調製した。

11. 生物#17 プローブを使用してコロニーをプローブするために、Boehringer Mannheimからのジゴキシゲニン系を使用した。

#### 結果

##### PCR定量

図 1Aおよび1B。図 1Aは、遺伝子特異的プライマーとハイブリダイズさせた場合に、実施例2のサンプル溶液a～fからのDNAのサザンハイブリダイゼーションアガロースゲル電気泳動カラムから得たオートラジオグラムの写真である。図 1Bは、ベクター特異的プライマーとハイブリダイズさせた場合に、実施例2のサンプル溶液a～fからのDNAのサザンハイブリダイゼーションアガロースゲル電気泳動カラムから得たオートラジオグラムの写真である。

サンプルaおよびbの遺伝子特異的DNA増幅は、該ビーズに対する非特異的結合が最小であることを示している。他の条件下で結合したDNAの量から、以下のとおり富化が推定される。

	<u>遺伝子特異的当量</u>	<u>合計</u>	<u>富化</u>
c	50ng	100pg	500×
d	50ng	30pg	1667×
e	20ng	50pg	400×
f	20ng	20pg	1000×

#### コロニーハイブリダイゼーション

図2は、陽性クローン（すなわち該プローブ中に含有されている配列を含有し、本発明に従い調製したライプラリーからのDNAを含有するコロニー）を示すプレートAおよびBから得た4個のコロニーハイブリダイゼーションプレートの写真である。

プレートCおよびDは対照であり、陽性クローンを示さなかった。

パニングされたサンプルからの92個のコロニーのうちの7個が、該プローブ中に含まれる配列に関して陽性であった。パニングされていないサンプル中に陽性クローンは見出されなかつた。

#### 実施例4 酵素活性アッセイ

以下は、実施例1に従い調製した発現ライプラリーをヒドロラーゼ活性についてスクリーニングする方法の代表的な実施例である。

実施例1に記載のとおりに調製したライプラリーのプレートを使用して、各ウェル内に200 μLのLB Amp/Meth, グリセロールを含有する単一のプレートに複数接種する。この工程は、1%漂白剤、水、イソプロパノール、各接種間の風乾滅菌サイクルを含むBeckman BiomekのHigh Density Replicating Tool (HDRT) を用いて行なう。該単一プレートを37°Cで2時間増殖させ、ついで、各ウェル内に250 μLのLB Amp/Meth, グリセロールを含有する2個の白色の96ウェルDynatechマイクロタイヤー娘プレートに接種するのに使用する。もとの単一プレートを37°Cで18時間インキュベートし、ついで-80°Cで保存する。その2個の濃縮娘プレートも、37°Cで18時間インキュベートする。ついで該濃縮娘プレートを70°Cで45分間加熱して細胞を殺し、宿主大腸菌 (E. coli) 酵素を失活させる。DMSO 中 5 mg/ml

Lのモルホウレア フェニルアラニル-7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン (MuPheAFC、「基質」) のストック溶液を、界面活性剤であるドデシルマルトシドの0.6mg/mLを含有する50mM (pH7.5) Hepes緩衝液で600μMになるまで希釈する。

#### MuPheAFC

600μM MuPheAFC溶液の50μLを、Biomekを用いる单一の100μL混合サイクルで白色の濃縮プレートの各ウェルへ加えて、基質の最終濃度を約100μMとする。基質の添加直後に (t=0) 、プレート読み取り蛍光光度計上で蛍光値を記録する (励起=400nm、発光=505nm)。該プレートを70℃で100分間インキュベートし、ついでさらに15分間、室温度にまで冷却する。該蛍光値を再び記録する (t=100)。t=100での値からt=0での値を引き算

して、活性クローンが存在するか否かを判定する。

これらのデータは、ある特定のウェル中のクローンの1つが該基質を加水分解しているかどうかを示すであろう。該活性を保持する個々のクローンを確認するために、その起源ライプラリープレートを解凍し、個々のクローンを用いて、LB Amp/Meth, グリセロールを含有する新たなプレートに1つずつ接種する。前記のとおり、該細胞を増殖させるために該プレートを37℃でインキュベートし、宿主酵素を失活させるために70℃で加熱し、600μM MuPheAFCの50μLを、Biomekを用いて加える。

該基質を加えた後、t=0の蛍光値を記録し、該プレートを70℃でインキュベートし、t=100分の値を前記のとおり記録する。これらのデータは、該活性クローンがどのプレート中に存在するかを示すであろう。

該基質に関するエナンチオ選択性比の値 (E) を以下の式から求める：

$$E = \ln[(1 - c(1 + ee_p))] / \ln[(1 - c(1 - ee_p))]$$

[式中、 $ee_p$  加水分解生成物のエナンチオマー過剰率 (ee) であり、c は反応の変換率 (%) である]。WongおよびWhitesides, Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, 1994, Elsevier, Tarrytown, New York, p. 9-12を参照のこと。

エナンチオマー過剰率は、キラル高速液体クロマトグラフィー (HPLC) または

キラルキャピラリー電気泳動（CE）のいずれかにより測定する。アッセイは、以下のとおり行なう。200 μLの適當な緩衝液、ついで50 μLの部分精製または完全精製された酵素溶液を、96ウェルの白色のマイクロタイプレートの各ウェルに加え、50 μLの基質を加え、該基質の50%が消費されるか反応が停止するかのいずれかが最初に生じるまで、蛍光の増加を時間に対してモニターする。

#### 実施例5

##### 陽性酵素活性クローンの突然変異誘発

ここに記載する2つの異なる戦略を用いて2つの異なる酵素（アルカリホスファターゼおよびβ-グリコシダーゼ）上で突然変異誘発を行って、野生型酵素より高い活性度を示す新規酵素を製造した。

##### アルカリホスファターゼ

製造業者のプロトコールに従い、生物OC9aからのアルカリホスファターゼ遺伝子をコードするゲノムクローン27a3a（プラスミドpBluescript中）でXL1-Red株（Stratagene）を

形質転換した。LB+0.1mg/mlアンピシリンの培養液5mlに該形質転換体200 μlを接種した。該培養物を37°Cで30時間増殖させた。ついで該培養上でミニプレップを行ない、製造業者のプロトコールおよび以下に概要を示す方法（「XL1 Blue細胞の形質転換」の後）に従い、得られたDNA 2 μlをXL1 Blue細胞（Stratagene）中に形質転換することによりスクリーニングを行なった。スクリーニングアッセイにおいて、突然変異したOC9aホスファターゼは発色に10分を要し、野生型酵素は発色に30分を要した。

##### 標準的なアルカリホスファターゼスクリーニングアッセイ

XL1 Red株の形質転換→LB/amp培養液5mlに形質転換体200 μlを接種し、37°Cで30時間インキュベートする→DNAのミニプレップ→XL1 Blue細胞の形質転換→LB/ampプレート上でのブレーティング→Duralon UV（Stratagene）またはHATF（Millipore）メンブレンによるコロニーのリフト→クロロホルム蒸気中での30秒間の溶菌→85°Cで30分間の加熱殺菌→BCIP緩衝液中室温でのフィルターの現像→フィルターが現像されるにつれて観察し、最も早く現像するコロニー（「陽性

体」)を同定し拾う→BCIPプレート上に「陽性体」を再びストリークする。

BCIP緩衝液:

20mm CAPS pH9.0

1 mm MgCl<sub>2</sub>

0.01mm ZnCl<sub>2</sub>

0.1mg/ml BCIP

$\beta$ -グリコシダーゼ

このプロトコールを用いて、サーモコッカス (*Thermococcus*) 9N2  $\beta$ -グリコシダーゼを突然変異誘発させた。

PCR反応

2マイクロリットルのdNTP (10mMストック)

10マイクロリットルの10×PCR緩衝液

0.5マイクロリットルのベクターDNA-31GIA-100ナノグラム

20マイクロリットルの3'プライマー (100pmol)

20マイクロリットルの5'プライマー (100pmol)

16マイクロリットルのMnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O (1.25mMストック)

24.5マイクロリットルのH<sub>2</sub>O

1マイクロリットルのTaqポリメラーゼ (5.0単位)

合計100マイクロリットル

反応サイクル

95°Cで15秒間

58°Cで30秒間

72°Cで90秒間

25サイクル (72°C~4°Cで10分の延長インキュベーション)

1%アガロースゲル上で5マイクロリットルを流し、反応を調べる。

Qiaquickカラム (Qiagen) 上で精製する。

50マイクロリットルのH<sub>2</sub>Oに再懸濁する。

制限消化

25マイクロリットルの精製されたPCR産物  
10マイクロリットルのNEB緩衝液#2  
3マイクロリットルのKpnI (10U/マイクロリットル)  
3マイクロリットルEcoRI (20U/マイクロリットル)  
59マイクロリットルのH<sub>2</sub>O  
37°Cで2時間切断する。  
Qiaquickカラム (Qiagen) 上で精製する。  
35マイクロリットルのH<sub>2</sub>Oで溶出する。

#### 連結反応

10マイクロリットルの消化されたPCR産物  
5マイクロリットルのベクター (EcoRI/KpnIで切断し、シュリンプアルカリホスファターゼでホスファターゼ処理したもの)  
4マイクロリットルの5×連結緩衝液  
1マイクロリットルのT4 DNAリガーゼ (BRL)  
一晩連結させる。  
エレクトロポレーションによりM15pREP4細胞中に形質転換する。  
100または200マイクロリットルをLB amp meth kanプレート上にプレーティングし、培養

氏37°Cで一晩増殖させる。

#### β-グリコシダーゼアッセイ

以下のとおりに突然変異体についてスクリーニングするためにグリコシダーゼアッセイを行なう。該フィルターアッセイには、基質 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシド (XGLU) (Diagnostic Chemicals LimitedまたはSigma) の1 mg/mlを含有する緩衝液Z (後記の調製法を参照されたい) を使用する。

Z-緩衝液 : (Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, p. 445を参照のこと)

1リットル当たり :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16.1g  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5.5g  
KCl 0.75g  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.246g  
 $\beta$ -メルカプトエタノール 2.7ml  
pHを7.0に調整する

(1) Millipore HATF メンブレンフィルターを使用してコロニーリフトを行う。

(2) 150mmガラスペトリ皿中でクロロホルム蒸気でコロニーを溶菌する。

(3) 1 mg/ml XGLUを含有するZ緩衝液で飽和したWhatman 3MM濾紙1枚を含有する100mmガラスペトリ皿へフィルターをトランスファーする。溶菌コロニーを担持するフィルターを該ガラスペトリ皿へトランスファーした後、皿を室温で維持する。

(4) フィルターメンブレン上で「陽性体」が青色の斑点として観察された（「陽性体」は、早期に出現する斑点である）。以下のフィルターレスキュー法により、溶菌された陽性コロニーからプラスミドを回収する。バストールビペット（またはガラス毛細管）を使用して、該フィルターメンブレン上の青色斑点の中心部を抜き取る。小さなフィルターディスクを、20  $\mu\text{l}$  の水を含有するEpp管に入れる。該Epp管を75°Cで5分間インキュベートし、ついでボルテックスしてプラスミドDNAをフィルターから溶出させる。このDNAをエレクトロコンピテント (electrocompetent) 大腸菌 (*E. coli*) 細胞中に形質転換する。形質転換プレート上でフィルターリフトアッセイを繰り返して、「陽性体」を同定する。フィルターリフトの後、形質転換プレートを37°Cのインキュベーターへ戻して、コロニーを再生

させる。再精製した陽性体を3 mlのLBamp液に接種し、37°Cで一晩インキュベートする。これらの培養物からプラスミドDNAを単離し、プラスミド挿入断片を配列決定する。

#### 実施例7

### 陽性酵素活性クローニングの定方向突然変異誘発

ここに記載する2つの異なる戦略を用いて2つの異なる酵素（アルカリホスファターゼおよび $\beta$ -グリコシダーゼ）上で定方向突然変異誘発を行って、野生型酵素より高い活性度をより低温で示す新規酵素を製造した。

#### アルカリホスファターゼ

製造業者のプロトコールに従い、生物OC9aからのアルカリホスファターゼをコードするDNA（プラスミドpBluescript）でXL1-Red株（Stratagene）を形質転換した。LB+0.1mg/mlアンピシリンの培養液5mlに該形質転換体200 $\mu$ lを接種した。該培養物を37℃で30時間増殖させた。ついで該培養上でミニプレップを行ない、製造業者のプロトコールに従い、得られたDNA 2 $\mu$ lをXL-1 Blue細胞（Stratagene）中に形質転換することによりスクリーニングを行なった。

#### 標準的なアルカリホスファターゼスクリーニングアッセイ

→LB/ampプレート上でのプレーティング→Duralon UV（Stratagene）またはHTF（Millipore）メンブレンによるコロニーのリフト→クロロホルム蒸気中での30秒間の溶菌→85℃で30分間の加熱殺菌→BCIP緩衝液中室温でのフィルターの現像→フィルターが現像されるにつれて観察し、最も早く現像されるコロニー（陽性体）を同定し拾う→BCIPプレート上に「陽性体」を再びストリークする。

#### BCIP緩衝液：

20mm CAPS pH9.0

1 mm MgCl<sub>2</sub>

0.01mm ZnCl<sub>2</sub>

0.1mg/ml BCIP

スクリーニングアッセイにおいて、突然変異したOC9aホスファターゼは発色に10分を要し、野生型酵素は発色に30分を要した。

#### $\beta$ -グリコシダーゼ

このプロトコールを用いて、サーモコッカス（Thermococcus）9N2  $\beta$ -グリコシダーゼを

コードするDNAを突然変異誘発させた。このDNA配列は図1に記載されてい

る。

PCR

2マイクロリットルのdNTP (10mMストック)  
10マイクロリットルの10×PCR緩衝液  
 $\beta$ -グリコシダーゼDNA (100ナノグラム) を含有する0.5マイクロリットル  
のpBluescriptベクターDNA  
20マイクロリットルの3' プライマー (100pmol)  
20マイクロリットルの5' プライマー (100pmol)  
16マイクロリットルのMnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O (1.25mMストック)  
24.5マイクロリットルのH<sub>2</sub>O  
1マイクロリットルのTaqポリメラーゼ (5.0単位)  
合計100マイクロリットル

反応サイクル

95°Cで15秒間  
58°Cで30秒間  
72°Cで90秒間  
25サイクル (72°C～4°Cで10分の延長インキュベーション)

1%アガロースゲル上で5マイクロリットルを流し、反応を調べる。  
Qiaquickカラム (Qiagen) 上で精製する。  
50マイクロリットルのH<sub>2</sub>Oに再懸濁する。

制限酵素消化

25マイクロリットルの精製されたPCR産物  
10マイクロリットルのNEB緩衝液#2  
3マイクロリットルのKpnI (10U/マイクロリットル)  
3マイクロリットルのEcoRI (20U/マイクロリットル)  
59マイクロリットルのH<sub>2</sub>O  
37°Cで2時間切断する。  
Qiaquickカラム (Qiagen) 上で精製する。  
35マイクロリットルのH<sub>2</sub>Oで溶出する。

### 連結反応

10マイクロリットルの消化されたPCR産物

5マイクロリットルのpBluescriptベクター (EcoRI/KpnI で切断し、シュリンプアルカリホスファターゼでホスファターゼ処理したもの)

4マイクロリットルの5×連結緩衝液

1マイクロリットルのT4 DNAリガーゼ (BRL)

一晩連結させる。

エレクトロポレーションによりM15pREP4細胞中に形質転換する。

100または200マイクロリットルをLB amp meth kanプレート上にプレーティングし、摂氏37℃で一晩増殖させる。

### β-グリコシダーゼアッセイ

以下のとおりに突然変異体についてスクリーニングするためにグリコシダーゼアッセイを行なう。フィルターアッセイには、基質 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルコピラノシド (XGLU) (Diagnostic Chemicals LimitedまたはSigma) の1mg/mlを含有する緩衝液Z (後記の調製法を参照されたい) を使用する。

Z-緩衝液： (Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, p. 445を参照のこと)

1リットル当たり：

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 16.1g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 5.5g

KCl 0.75g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.246g

$\beta$ -メルカプトエタノール 2.7ml

pHを7.0に調整する

(1) Millipore HATFメンブレンフィルターを使用してコロニーリフトを行なう。

(2) 150mmガラスペトリ皿中でクロロホルム蒸気でコロニーを溶菌する。

(3) 1mg/ml XGLUを含有するZ緩衝液で飽和したWhatman 3MM滤紙1枚を含有

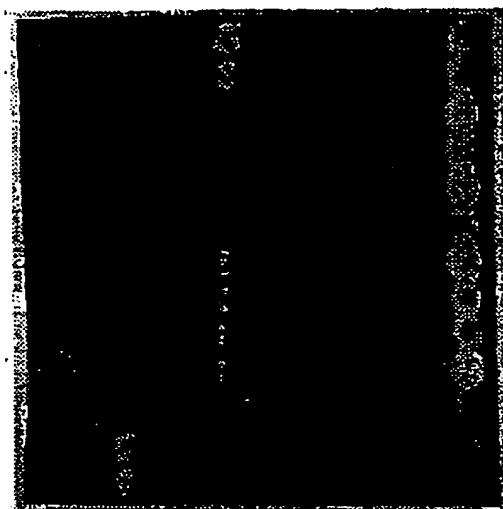
する100mmガラスペトリ皿へフィルターをトランスファーする。溶菌コロニーを担持するフィルターを該ガラスペトリ皿へトランスファーした後、皿を室温で維持する。

(4) フィルターメンブレン上で「陽性体」が青色の斑点として観察された（「陽性体」は、早期に出現する斑点である）。以下のフィルターレスキュー法により、溶菌された陽性コロニーからプラスミドを回収する。パストールピペット（またはガラス毛細管）を使用して、該フィルターメンブレン上の青色斑点の中心部を抜き取る。小さなフィルターディスクを、20μlの水を含有するEpp管に入れ。該Epp管を75°Cで5分間インキュベートし、ついでボルテックスしてプラスミドDNAをフィルターから溶出させる。このDNAをエレクトロコンピント（electrocompetent）大腸菌（*E. coli*）細胞中に形質転換する。形質転換プレート上でフィルターリフトアッセイを繰り返して、「陽性体」を同定する。フィルターリフトの後、形質転換プレートを37°Cのインキュベーターへ戻して、コロニーを再生させる。再精製した陽性体を3mlのLBamp液に接種し、37°Cで一晩インキュベートする。これらの培養物からプラスミドDNAを単離し、プラスミド挿入断片を配列決定する。

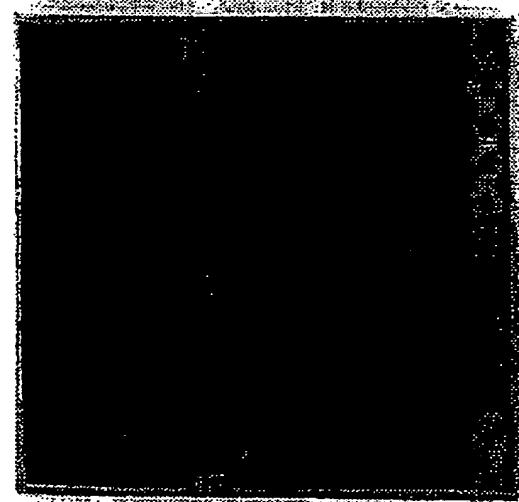
突然変異誘発に供したβ-グリコシダーゼは、野生型β-グリコシダーゼより2.5倍効率的にXGLUに作用した。

前記の教示を考慮して、本発明の多数の修飾および変形が可能である。したがって、本発明は、請求の範囲の範囲内において、特に記載されていないものであっても実施され得る。

【図1】



10 ng (lib 17)  
1 ng  
100 pg  
10 pg  
a  
b  
c 遺伝子特異的プライマー  
d (1:100 希釀 )  
e  
f  
標準



1 pg (lib 17)  
100 fg  
10 fg  
1 fg  
a  
b  
c ベクター特異的プライマー  
d (1:1000 希釀 )  
e  
f  
標準

【図2】

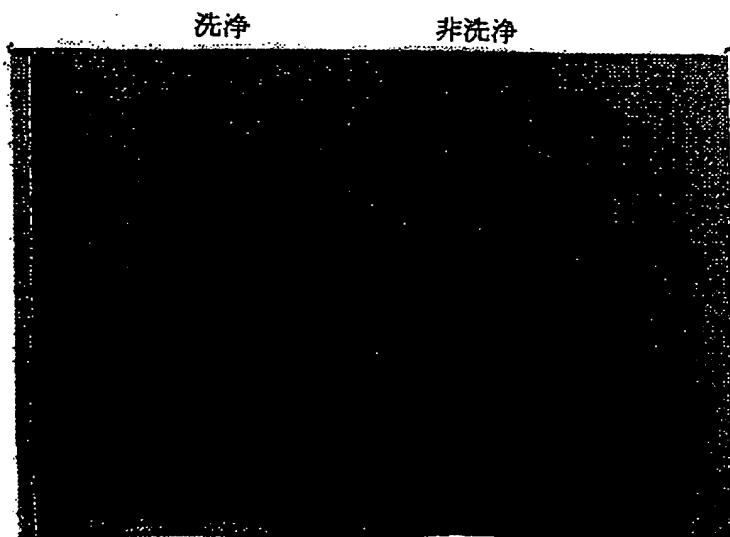


FIG. 2

## FIG. 3A

→  
FIG. 3Bに続く

1 ATG CTA CCA GAA GGC TTT CTC TGG GGC GTG  
 1 Met Leu Pro Glu Gly Phe Leu Trp Gly Val  
  
 61 GAC AAG CTC AGG AGG AAC ATT GAT CCG AAC  
 21 Asp Lys Leu Arg Arg Asn Ile Asp Pro Asn  
  
 121 TTC AAC ATA AAG AGG GAA CTC GTC AGC GGC  
 41 Phe Asn Ile Lys Arg Glu Leu Val Ser Gly  
  
 181 GAA CTT TAC GAG AAG GAT CAC CCC CTC GCC  
 61 Glu Leu Tyr Glu Lys Asp His Pro Leu Ala  
  
 241 GGA ATA GAG TGG AGC AGG ATC TTT CCC TGG  
 81 Gly Ile Glu Trp Ser Arg Ile Phe Pro Trp  
  
 301 CGG GAC AGC TAC GGA CTC GTG AAG GAC GTC  
 101 Arg Asp Ser Tyr Gly Leu Val Lys Asp Val  
  
 361 GAC GAG ATA GCG AAT CAT CAG GAG ATA GCC  
 121 Asp Glu Ile Ala Asn His Gln Glu Ile Ala  
  
 421 GAG CTG GGC TTC AAG GTC ATC GTG AAC CTC  
 141 Glu Leu Gly Phe Lys Val Ile Val Asn Leu  
  
 481 GAT CCG ATA ATC GCG AGG GAG AAG GCC CTC  
 161 Asp Pro Ile Ile Ala Arg Glu Lys Ala Leu  
  
 541 GAG AGC GTG GTG GAG TTC GCC AAG TAC GCG  
 181 Glu Ser Val Val Glu Phe Ala Lys Tyr Ala

FIG. 3 Cに続く

[図3]

← FIG. 3 Aに続く

## FIG. 3 B

TCC CAG TCC GGC TTT CAG TTC GAG ATG GGC	60
Ser Gln Ser Gly Phe Gln Phe Glu Met Gly	20
ACA GAC TGG TGG AAG TGG GTC AGG GAT CCC	120
Thr Asp Trp Trp Lys Trp Val Arg Asp Pro	40
GAC CTG CCC GAG GAG GGG ATA AAC AAC TAC	180
Asp Leu Pro Glu Glu Gly Ile Asn Asn Tyr	60
AGA GAC CTC GGT CTG AAC GTT TAC AGG ATT	240
Arg Asp Leu Gly Leu Asn Val Tyr Arg Ile	80
CCA ACG TGG TTT GTG GAG GTT GAC GTT GAA	300
Pro Thr Trp Phe Val Glu Val Asp Val Glu	100
AAA ATC GAT AAA GAC ACG CTC GAA GAG CTC	360
Lys Ile Asp Lys Asp Thr Leu Glu Glu Leu	120
TAC TAC CGC CGC GTT ATA GAG CAC CTC AGG	420
Tyr Tyr Arg Arg Val Ile Glu His Leu Arg	140
AAC CAC TTC ACG CTC CCC CTC TGG CTT CAC	480
Asn His Phe Thr Leu Pro Leu Trp Leu His	160
ACC AAC GGT AGG ATT GGC TGG GTC GGG CAG	540
Thr Asn Gly Arg Ile Gly Trp Val Gly Gln	180
GCG TAC ATC GCG AAC GCA CTC GGG GAC CTC	600
Ala Tyr Ile Ala Asn Ala Leu Gly Asp Leu	200

FIG. 3Dに続く

FIG. 3 A に続く

## FIG. 3C

→ FIG. 3D に続く

601 GTT GAT ATG TGG AGC ACC TTC AAC GAR CCG  
 201 Val Asp Met Trp Ser Thr Phe Asn Glu Pro

661 CCC TAC TCC GGY TTT CCN CCG GGG GTT ATG  
 221 Pro Tyr Ser Gly Phe Pro Pro Gly Val Met

721 AAC ATG ATA AAC GCC CAC GCA CTG GCC TAC  
 241 Asn Met Ile Asn Ala His Ala Leu Ala Tyr

781 GCC GAT AAG GAT TCC CGC TCC GAG GCC GAG  
 261 Ala Asp Lys Asp Ser Arg Ser Glu Ala Glu

841 NCC TAT CCA NAC GAC TCC AAC GAC CCN AAG  
 281 Xxx Tyr Pro Xxx Asp Ser Asn Asp Pro Lys

901 TTC CAC AGC GGG CTC TTC TTC GAC GCA ATC  
 301 Phe His Ser Gly Leu Phe Phe Asp Ala Ile

961 GGT GAG ACC TTC GTC AAA GTT CGG CAT CTC  
 321 Gly Glu Thr Phe Val Lys Val Arg His Leu

1021 TAC ACG AGA GAA GTC GTC AGG TAT TCG GAG  
 341 Tyr Thr Arg Glu Val Val Arg Tyr Ser Glu

1081 TTC CGG GGA GTT CAC AAC TAC GGT TAC GCC  
 361 Phe Arg Gly Val His Asn Tyr Gly Tyr Ala

1141 AGG CCC GTA AGC GAC ATC GGC TGG GAG ATC  
 381 Arg Pro Val Ser Asp Ile Gly Trp Glu Ile

FIG. 3E に続く

【図3】

FIG. 3B に続く

← FIG. 3D

FIG. 3C に続く

ATG GTC GTT GTG GAN CTC GGT TAC CTC GCG	660
Met Val Val Val XXX Leu Gly Tyr Leu Ala	220
AAC CCC GAG GCG GMN AAN CTG GCA ATC CTC	720
Asn Pro Glu Ala XXX XXX Leu Ala Ile Leu	240
AAG ATG ATA AAG AAG TTC GAC AGG GTA AAG	780
Lys Met Ile Lys Lys Phe Asp Arg Val Lys	260
GTC GGG ATA ATC TAC AAC AAC ATA GGC GTT	840
Val Gly Ile Ile Tyr Asn Asn Ile Gly Val	280
GAC GTG AAA NCT NCA GAA AAC GAC AAC TAC	900
Asp Val Lys XXX XXX Glu Asn Asp Asn Tyr	300
CAC AAG GGC AAG CTC AAC ATC GAG TTC GAC	960
His Lys Gly Lys Leu Asn Ile Glu Phe Asp	320
AGG GGG AAC GAC TGG ATA GGC GTT AAC TAC	1020
Arg Gly Asn Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr	340
CCC AAG TTC CCG AGC ATA CCC CTG ATA TCC	1080
Pro Lys Phe Pro Ser Ile Pro Leu Ile Ser	360
TGC AGG CCC GGG AGT TCT TCC GCC GAC GGA	1140
Cys Arg Pro Gly Ser Ser Ser Ala Asp Gly	380
TAT CCG GAG GGG ATC TAC GAC TCG ATA AGA	1200
Tyr Pro Glu Gly Ile Tyr Asp Ser Ile Arg	400

FIG. 3F に続く

【図3】

FIG. 3Cに続く

FIG. 3E

→ FIG. 3Fに続く

1201 GAG GCC AAC AAA TAC GGG GTC CCG GTT TAC  
401 Glu Ala Asn Lys Tyr Gly Val Pro Val Tyr

1261 GAC ACC CTG CGG CCG TAC TAC CTC GCG AGC  
421 Asp Thr Leu Arg Pro Tyr Tyr Leu Ala Ser

1321 GCG GGT TAC GAC GTC AGG GGC TAC CTC TAC  
441 Ala Gly Tyr Asp Val Arg Gly Tyr Leu Tyr

1381 CTC GGT TTC AGG ATG AGG TTC GGC CTC TAT  
461 Leu Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Tyr

1441 CCG CGG GAG GAA AGC GTA AAG GTT TAT AGG  
481 Pro Arg Glu Glu Ser Val Lys Val Tyr Arg

1501 GAA ATC CGG GAG AAG TTC GGA CTT GGG TGA  
501 Glu Ile Arg Glu Lys Phe Gly Leu Gly End

FIG. 3A	FIG. 3B
FIG. 3C	FIG. 3D
FIG. 3E	FIG. 3F

FIG. 3

FIG. 3Dに続く

←

FIG. 3Eに続く

## F | G. 3F

;TC ACC GAA AAC GGA ATA GCC GAT TCA ACT 1260  
 'al Thr Glu Asn Gly Ile Ala Asp Ser Thr 420

;AT GTA GCG AAG ATT GAG GAG GCG TAC GAG 1320  
 'is Val Ala Lys Ile Glu Glu Ala Tyr Glu 440

;GG GCG CTG ACC GAC AAC TAC GAG TGG GCC 1380  
 'rp Ala Leu Thr Asp Asn Tyr Glu Trp Ala 460

;AA GTG GAT CTC ATA ACC AAG GAG AGA ACA 1440  
 'ys Val Asp Leu Ile Thr Lys Glu Arg Thr 480

;GC ATC GTG GAG AAC AAC GGA GTG AGC AAG 1500  
 ;ly Ile Val Glu Asn Asn Gly Val Ser Lys 500

1530

510

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US96/19457
---

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC(6) : C12N 9/00

US CL : 435/183

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/183

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN: Medline, Caplus, Biosis, Embase and WPI/DS

APS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----	OSUNA et al. Combinatorial mutagenesis of three major groove-contacting residues of EcoRI: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitive activity. Gene. 1991, Vol. 106, pages 7-12, see the abstract.	6-11, 13-21 and 24-26 -----
Y ----	DUBE et al. Artificial mutants generated by the insertion of random oligonucleotides into the putative nucleoside binding site of the HSV-1 thymidine kinase gene. Biochemistry. 1991, Vol. 30, pages 11760-11767, see abstract.	1-5, 12, 22, and 23 -----
X ----		6-11, 13-21 and 24-26 -----
Y		1-5, 12, 22 and 23

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
*A*	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
*B*	earlier document published on or after the international filing date
*C*	document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special issues (as specified)
*D*	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other source
*E*	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"Z"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  24 JANUARY 1997	Date of mailing of the international search report  05 MAR 1997
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer NASHAAT T. NASHED Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/19457

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Caption of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BURIONI et al. Engineering human monoclonal antibody fragments: A recombinant enzyme-linked Fab. Microbiologica. April 1995, Vol. 18, pages 127-133, see abstract.	6-11, 13-21 and 24-26
---		-----
Y	BORREGO et al. Combinatorial libraries by cassette mutagenesis. Nucleic Acid Research. 1995, Vol. 23, No. 10, pages 1834-1835, see page 1834, left column, first paragraph.	1-5, 12, 22 and 23
		1-26

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)\*

---

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 60／008, 317  
(32) 優先日 平成7年12月7日(1995. 12. 7)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 08／651, 568  
(32) 優先日 平成8年5月22日(1996. 5. 22)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(31) 優先権主張番号 08／692, 002  
(32) 優先日 平成8年8月2日(1996. 8. 2)  
(33) 優先権主張国 米国(US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L  
U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, IL, J  
P